Prof. Dr. Paul Th. Müller

Technik der Serodiagnostischen Methoden

Dritte Auflage

Jena,
Verlag von Gustav Fischer

22102096584

Med
K17712

M. H. Gordon

Digitized by the Internet Archive
in 2016

https://archive.org/details/b28112192

TECHNIK
DER
SERODIAGNOSTISCHEN METHODEN.

VON

DR. PAUL TH. MÜLLER,
A. O. PROFESSOR DER HYGIENE AN DER UNIVERSITÄT GRAZ.

DRITTE AUFLAGE.

MIT 7 ABBILDUNGEN IM TEXT.

JENA,
VERLAG VON GUSTAV FISCHER,
1910.

ALLE RECHTE VORBEHALTEN.

WELLCOME INSTITUTE LIBRARY
Coll wellMOmec
Call No.

Vorwort
zur zweiten Auflage.

Vorliegende Zusammenstellung der wichtigsten serodiagnostischen Methoden, die ich mir zu Kurszwecken zu machen genötigt war, dürfte vielleicht manchem willkommen sein, der die Mühe scheut, sich die in der Literatur verstreuten Daten selbst zusammenzusuchen. Theoretisches wurde, dem rein praktischen Zwecke des Büchleins entsprechend, vollkommen beiseite gelassen: dagegen wurde das Hauptgewicht auf eine möglichst genaue Beschreibung des Methodischen gelegt, und wurden besonders die zur Anstellung jeder Reaktion erforderlichen Reagenzien und Gerätschaften möglichst vollständig aufgezählt. Mit Absicht wurden auch manche Methoden aufgenommen, von denen es noch nicht vollkommen sichersteht, ob sie sich auch bewähren werden; denn gerade diese verdienen ja eine besonders eingehende Prüfung und vielseitige Anwendung. Von Neuerungen gegenüber der ersten Auflage seien erwähnt: ein Abschnitt über Konservierung der Sera; über den Nachweis von Fleischverfälschungen nach Uhlenhuth, Weidanz und Wedemann; über die Ausflockungsreaktionen, speziell die Luesdiagnose durch Lezithinausflockung, durch Ausflockung von glycocholsaurem Natron, und die Klausnersche Reaktion; über die Morosche Alexinprobe; endlich über verschiedene

Modifikationen der Wassermannschen Luesdiagnose, die von Täge, Hähne, Bauer, Tschernobugoff angegeben worden sind.

Eine sichere Beherrschung der serodiagnostischen Verfahren kann natürlich nur durch Übung und Erfahrung erworben werden. Ich würde mich freuen, wenn vorliegendes Büchlein dem Anfänger auf diesem Gebiet die Arbeit erleichtern könnte.

Paul Th. Müller.

Vorwort
zur dritten Auflage.

Die dritte Auflage dieses Büchleins, die schon nach kurzer Zeit notwendig geworden ist, kann sich naturgemäß nur wenig von ihrer Vorgängerin unterscheiden. Neu aufgenommen wurden das verfeinerte und vereinfachte Verfahren der Luesdiagnose nach Stern, ferner die Much-Holzmannsche „Psychoreaktion" und die Bestimmung der antitryptischen Kraft des Blutes nach Müller und Jochmann (modifiziert von Marcus), und nach Bergmann und Meyer. Dem an sich berechtigten Wunsche eines der Kritiker dieses Büchleins, es möchten jene Methoden, welche sich nicht bewährt hätten, bei einer nächsten Auflage unbarmherzig gestrichen werden, konnte diesmal noch nicht Folge geleistet werden, da die Zeit, die zu ihrer praktischen Erprobung zur Verfügung stand, wohl noch eine zu kurze ist.

Paul Th. Müller.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Technik der Injektion.

A. Intraperitoneale Injektion bei Kaninchen zum Zweck der Gewinnung von Immunserum 1
B. Technik der intravenösen Injektion beim Kaninchen . . 1

Technik der Blutentnahme.

C. Blutentnahme aus der Ohrvene des Kaninchens zur Gewinnung kleiner Serummengen 2
D. Blutentnahme zur Gewinnung größerer Serummengen beim Kaninchen 4
E. Blutentnahme bei anderen Tieren 5
F. Blutentnahme zur Gewinnung kleiner Serummengen . . 6
1. Verfahren nach PRÖSCHER 6
2. Verfahren nach CZAPLEWSKI-SCHOTTELIUS . . 8
G. Gewinnung größerer Mengen menschlichen Blutes . . . 9
H. Gewinnung von defibriniertem Blut bzw. von roten Blutkörperchen 10

Konservierung der Sera.

1. Sera normaler Tiere 11
2. Immunsera 12
a) Konservierung im flüssigen Zustand durch Zusatz von Antisepticis 12
b) Konservierung im flüssigen Zustand durch keimfreie Filtration 13
c) Konservierung im eingefrorenen Zustand 16
d) Konservierung im getrockneten Zustand 16
e) Konservierung im Tierkörper selbst 18

Seite

Technik der diagnostischen Methoden.

I. Präzipitinreaktionen 19
A. Unterscheidung von Menschen- und Tierblut bzw. Eiweiß 19
B. Nachweis von Fleischverfälschungen. Technik nach UHLENHUTH, WEIDANZ und WEIDEMANN . 24
C. Serodiagnostik der Syphilis (nach FORNET und SCHERESCHEWSKY) 30
II. Ausflockungsreaktionen 31
A. Luesdiagnose nach PORGES und MEIER . . . 31
B. Luesdiagnose nach ELIAS, NEUBAUER, PORGES und SALOMON 32
C. Luesdiagnose nach KLAUSNER 33
III. Agglutinationsreaktionen 34
A. Agnoszierung einer fraglichen, aus Dejekten, Wasser usw. isolierten Bakterienart 34
1. Im Reagenzglas angestellt 34
2. Im hängenden Tropfen angestellt . . . 37
B. Prüfung des Serums eines Patienten auf Agglutination (WIDALsche Reaktion) 38
1. Im Reagenzglas angestellt 38
a) Verfahren nach PRÖSCHER 38
b) Verfahren nach KAFKA 41
2. Im hängenden Tropfen angestellt . . . 43
C. Diagnose von Mischinfektionen mit Hilfe der Agglutinationsprobe (Absättigungsversuch von CASTELLANI) 44
IV. Bakterizide Reaktionen 46
A. Im Tierversuch (PFEIFFERsche Reaktion) . . . 46
1. Agnoszierung einer fraglichen, aus Dejekten, Wasser usw. isolierten Bakterienart . 46
2. Nachweis von bakteriziden Antikörpern im Serum von Kranken usw. 49
B. Bakterizider Reagenzglasversuch. Nachweis bakterizider Substanzen im Blutserum von Kranken 50
V. Hämolytische Reaktionen 54
„Klinische Alexinprobe" nach MORO 54
VI. Antihämolytische Reaktionen (Verfahren der Komplementablenkung) 56
A. Nachweis eiweißhaltiger Antigene (z. B. von Menscheneiweiß in Blutflecken) 57

Seite

B. Nachweis von Antikörpern im Serum, Zerebrospinalflüssigkeit oder Gewebe von Kranken . . 63
Luesdiagnose 64
1. Technik nach WASSERMANN und MEIER (Berliner Methode) 64
2. Technik nach TÄGE (Breslauer Methode) . 67
3. Technik nach HOEHNE (Frankfurter Methode) 70
4. Vereinfachte und verfeinerte Technik nach STERN 72
5. Vereinfachte Technik nach BAUER . . . 73
6. Vereinfachte Technik nach TSCHERNOBUGOFF 75
7. Technik nach LANDSTEINER, PÖTZL und MÜLLER 77

VII. Antihämolytische Reaktionen. Hemmung der Cobragifthämolyse („Psychoreaktion" von MUCH und HOLZMANN) 78

VIII. Antifermentative Reaktionen. Bestimmung der antitryptischen Kraft des Blutserums 79
1. Technik nach MARCUS (MÜLLER u. JOCHMANN 80
2. Technik nach v. BERGMANN u. MEYER . 81

IX. Phagozytäre Reaktionen (Bestimmung der opsonischen Kraft eines Serums) 83
1. Technik nch BINE und LISSNER . . . 83
2. Klinische Opsoninbestimmung nach KÄMMERER 89

X. Nachweis von Antistaphylolysin 91

XI. Nachweis von Diphtherietoxin 94

Technik der Injektion.

A. Intraperitoneale Injektion beim Kaninchen zum Zweck der Gewinnung von Immunserum (nach Uhlenhuth).

Ein Gehilfe umfaßt mit seiner linken Hand die beiden Hinterbeine des Kaninchens, hält dieselben nach oben, während die rechte Hand beide Vorderbeine umfaßt und sie nach abwärts hält, so daß der Kopf des Tieres senkrecht nach unten sieht. Auf diese Weise wird erreicht, daß die Gedärme möglichst in die obere Hälfte der Bauchhöhle hineinfallen. Die Bauchfläche des senkrecht gehaltenen Tieres wird demjenigen, der die Injektion ausführt, zugewandt. Dieser wählt als Stelle der Einspritzung die Unterbauchgegend, entfernt dort vermittelst einer Schere die Haare, schneidet dann mit ausgeglühter und wieder erkalteter Schere die zur Falte erhobene Oberhaut durch, so daß an einer etwa erbsengroßen Stelle die Muskulatur freiliegt. Mit stumpfer Kanüle wird nun die Bauchwand vorsichtig durchstoßen, dann die Spritze angesetzt und die betreffende Flüssigkeit eingespritzt. Nach Herausziehen der Nadel wird die kleine Wunde mit Kollodiumwattebausch verschlossen. — Steht keine Assistenz zur Verfügung, so bindet man das Kaninchen auf eines der üblichen Tierbretter auf.

B. Intravenöse Injektion beim Kaninchen.

Zur Injektion in die Randvene des Ohres eignen sich am besten langohrige Kaninchenrassen, während sich bei

kurzohrigen Tieren, besonders für Anfänger, oft Schwierigkeiten ergeben. Man entfernt mit der Schere zuerst die Haare, welche an der Stelle sich befinden, wo man injizieren will, und reibt dann das ganze Ohr kräftig mit einem in Äther getränkten Wattebausch ab (oder bedeckt die Ohrwurzel mit einem in heißes Wasser getauchten Wattebausch), worauf sich die Gefäße stark zu füllen beginnen. Noch zweckmäßiger ist es jedoch, das Ohr während der ganzen folgenden Prozedur aus nächster Nähe mit einer elektrischen Glühbirne zu bestrahlen. Dann sticht man die — bereits mit der Spritze armierte — scharfe Kanüle flach ein, gleitet mit derselben ein Stück vorwärts, um sich zu überzeugen, daß man sich wirklich im Venenlumen befindet und injiziert dann langsam unter geringem Druck. Natürlich hat man darauf zu achten, daß keine Luftblasen mit injiziert werden. Zweckmäßig ist es, schon während des Einspritzens eine Sperrpinzette an der Einstichstelle anzulegen, welche zunächst natürlich, da sie ja die Metallkanüle umgreift, nicht absperrt, aber sofort in Funktion tritt, wenn man die Kanüle aus der Vene herausgezogen hat. Dieselbe verhindert dann ein eventuelles Zurückfließen der injizierten Masse und vor allem eine stärkere Blutung aus der Vene.

Technik der Blutentnahme.

C. Blutentnahme aus der Ohrvene des Kaninchens zur Gewinnung kleiner Serummengen.

Am besten eignen sich auch hierzu langohrige Kaninchenrassen, während von kurzohrigen Tieren manchmal nur sehr geringe Blutmengen zu erhalten sind. Wie unter B beschrieben, bringt man die Blutgefäße des Ohres zur Er-

weiterung und durchschneidet dann die geschwellte Randvene möglichst weit zentralwärts mit einer Schere oder mit einem scharfen Skalpell. Das abtropfende Blut kann man entweder in einem engen Reagenzröhrchen oder, wenn man nur wenige Zehntel eines Kubikzentimeters benötigt, in engen Kapillarröhrchen (s. Fa, S. 6) auffangen. Die maximale Ausbeute bei dieser Methode beträgt 10 ccm und unter günstigen Umständen sogar noch mehr. Zur Stillung der Blutung genügt es, auf die Wunde einen kleinen Wattebausch aufzulegen und denselben mittels einer Sperrpinzette festzuklemmen. Die Pinzette kann meist nach wenigen Minuten wieder abgenommen werden. — Ein großer Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, daß die Blutentnahme bei demselben Tiere oftmals wiederholt werden kann.

Die weitere Verarbeitung des gewonnenen Blutes zur Serumgewinnung geschieht folgendermaßen. Hat man das Blut in Kapillaren aufgefangen, so verfährt man, wie unter F beschrieben (S. 7).

Hat man dagegen Reagenzröhrchen benutzt, so kann man dieselben zur Abscheidung des Serums entweder

a) 24^h bei 10—14° C (also eventuell im laufenden Leitungswasser) stehen lassen, und dann das ausgepreßte Serum in ein zweites Röhrchen abgießen, oder aber man kann

b) den Blutkuchen nach erfolgter Gerinnung mittels eines starken Platindrahts von der Wandung des Röhrchens ablösen, kräftig zentrifugieren und so das Serum sofort gewinnen.

Da beim Abgießen des Serums leicht Blutkörperchen mit aufgewirbelt werden, so wird man meistens genötigt sein, das Serum noch ein zweites Mal zu zentrifugieren und neuerdings vorsichtig von dem Bodensatz abzugießen. Man kann das Serum aber auch mit Hilfe einer Pipette, deren Spitze nach oben umgebogen ist, absaugen.

D. Blutentnahme zur Gewinnung größerer Serummengen beim Kaninchen.

1. Das Tier wird tief ehloroformiert, dann auf ein Brett gespannt, die Brust und Bauchfläehe mit Alkohol abgerieben (um die Verunreinigung des Blutes dureh Haare zu vermeiden), dureh einen Längssehnitt die Weiehteile von der Brustseite naeh beiden Seiten getrennt und die vordere Brustwand entfernt. Bei den letzten sehwaehen Herzsehlägen trennt ein großer Schnitt die Herzkammern, das Tier verblutet in die Brusthöhlen, währenddessen sehnell die Lungen entfernt werden und das Blut mit einer Pipette mit unterer weiter Öffnung aufgesogen und in einen Meßzylinder gefüllt wird. Darin bleibt das Blut bei etwa 10—15° C 24 Stunden lang stehen, wenn man nieht vorzieht, dasselbe sofort in Reagenzgläser einzupipettieren, und naeh erfolgter Gerinnung zu zentrifugieren. Bezüglieh der weiteren Verarbeitung siehe C (S. 3).

2. Man kann zur Blutgewinnung aueh in folgender Weise verfahren: Man hebt an dem aufgebundenen oder dureh einen Assistenten gehaltenen Tier eine große Längsfalte am Halse auf, die man dureh einen kräftigen Seherensehlag entfernt. Es liegen nun die Halsmuskeln und darunter die Traehea in großer Ausdehnung frei. Mit Sehere und Pinzette wird dann die Muskelsehieht durchtrennt und die Karotis freigelegt. Naeh stumpfer Isolierung derselben legt man dichtnebeneinander zwei kleine Sperrpinzetten an, sehneidet die Karotis zwisehen beiden dureh und hält nun das zentrale Ende mit der Spitze der Pinzette in das zum Auffangen des Blutes bestimmte weithalsige Gefäß. Nun wird mittels einer feinen Schere die Wand der Karotis zentralwärts von der Pinzette seitlich angesehnitten und das Blut in das sterile Gefäß einströmen gelassen. Durch Druek auf das Abdomen und auf den Thorax des Tieres kann

man die Ausbeute an Blut etwas vergrößern. Die weitere Behandlung des Blutes geschieht wie bei C (S. 3).

3. Ein drittes Verfahren der Blutgewinnung (Beschreibung nach Heim) ist endlich folgendes:

Zur sicheren keimfreien Blutentnahme dient ein etwa 25 cm langes und 16 mm weites Glasrohr, das an seinem unteren Ende zu einer im stumpfen Winkel gebogenen, mehrere Zentimeter langen, zunächst zugeschmolzenen Kapillare ausgezogen ist. Es wird, oben mit Wattestopfen versehen, sterilisiert. Ist nun an dem aufgebundenen Tier die Karotis freigelegt, so klemmt man sie mit einer kleinen Arterienklemme zu, führt zentral einen Seitenfaden unter dem Gefäß durch und sticht herzwärts das kapillare Ende des Rohres, dessen Spitze kurz zuvor abgebrochen wurde, so vorsichtig ein, daß man nicht auf der anderen Seite wieder herauskommt. Jetzt wird durch einen Gehilfen der Seidenfaden um die Arterie gelegt und auf der Kapillare festgebunden. Unterdessen ist, wenn alles gelungen, das Blut bereits in die Glasröhre eingeflossen. Durch vorsichtiges Saugen über dem Wattestopfen kann man eine etwa eintretende Verstopfung aufheben. Man erhält auf diese Weise von einem großen Tier etwa 60 ccm Blut. Braucht man nicht so viel, so wird man das Glasrohr eher herausziehen, während die Arterie zuvor peripher und dann auch zentral mit einer Ligatur versehen wird.

Das blutgefüllte Glasrohr kann an seinem unteren kapillaren Ende durch einen Tropfen Siegellack verschlossen werden und dann zur Serumabscheidung zentrifugiert oder aber in kühlem Raume 24 Stunden stehen gelassen werden.

E. Blutentnahme bei anderen Tieren.

Zur Blutgewinnung bei größeren Tieren (Pferd, Schaf, Ziege), ist es am besten, die Jugularvene durch einen um den Hals gelegten Strick anschwellen zu machen und dann

(nach Rasieren und gründlicher Desinfektion der darüberliegenden Haut) mit sterilem Troikart in die Vene einzustechen.

Auch bei der Schlachtung kann man leicht steriles Blut gewinnen, indem man, nach Abfließenlassen der ersten Portion, das Blut unter Beachtung aseptischer Kautelen in großen, etwa 600 ccm fassenden sterilisierten Glaszylindern von etwa 6 cm Durchmesser auffängt. Nach Absetzenlassen des Serums wird dieses mit großen, 50 ccm fassenden sterilen Pipetten abgehoben und in weiten Reagenzgläsern im Eisschrank aufbewahrt. Zur besseren Ausnutzung des Blutes kann man den Blutkuchen durch ein steriles Gewicht beschweren und so die Serumabscheidung befördern. Eventuell, wenn Gefahr einer Verunreinigung vorliegt, muß das Serum durch ein (sterilisiertes) Berkefeldt-Filter filtriert werden.

Bei Hausvögeln gewinnt man das Blut am besten aus den an der Innenseite der Flügel gelegenen Flügelgefäßen oder auch aus der Karotis (Ösophagus oder Trachea nicht verletzen!)

F. Blutentnahme zur Gewinnung kleiner Serummengen beim Menschen.

Zur Gewinnung kleiner Blutmengen, wie sie für die Anstellung der Widalschen Reaktion und der meisten anderen Serumreaktionen ausreichen, verfährt man folgendermaßen:

1. Verfahren nach Pröscher[1]).

Hierzu werden benötigt

a) U-förmige (oder auch einfache gerade) Röhrchen aus dünnem Glas von etwa 2 mm äußerem

1) Pröscher, Zentralbl. f. Bakt. 1902, Bd. XXXI.

Durchmesser, die an den Enden ein wenig ausgezogen sind. Die Länge der Röhrchen bezw. Röhrchensehenkel richtet sich nach der Größe der zur Verfügung stehenden Zentrifuge.

b) Alkoholäther und Watte.

c) Ein scharfes Skapell (am besten mit beidseitiger Schneide) oder ein verstellbarer Schnepper mit Platiniridiumspritze (erhältlich bei F. u. M. Lautenschläger [Berlin]).

d) Siegellaek oder eine andere Klebmasse.

e) Eine Glasfeile oder Glaserstahl.

f) Eventuell: etwas Eisenchloridwatte.

Ausführung.

Am Ohrläppchen wird, nach vorheriger Abreibung mit einem in Alkoholäther getauchten Wattebausch, nahe der Spitze, am äußeren Rande ein Schnitt von etwa 1 cm Länge und mäßiger Tiefe gemacht. Der aus demselben hervorquellende Blutstropfen darf nicht herablaufen, was eventuell durch Abwischen mit einem trockenen sauberen Tuch verhindert wird. Es wird dann eines der Röhrchen an den Tropfen angesetzt oder auch direkt in den Schnitt hineingehalten, wobei das Blut durch Kapillarität angesogen wird. Sollte Verstopfung des Röhrchens eintreten, so ist schnell ein zweites oder drittes anzusetzen. Mit einiger Geduld und geringer Übung wird man stets genügend Blut erhalten. Sollte es stärker bluten, so kann man die Blutung durch einen aufgelegten Bausch von Eisenchloridwatte leicht stillen. Auch aus der Fingerbeere ist, nach Anlegung einer Stauungsbinde oder nach kräftigem Schwingen des Armes, leicht die nötige Blutmenge zu gewinnen. Die gefüllten Röhrchen werden dann an beiden Enden durch einen Tropfen Siegellack verschlossen, wobei daran erinnert sei, daß die Klebmasse an dem feuchten Glase nicht haftet. Es kann daher

unter Umständen vorsichtiges Erwärmen der äußersten Röhrchenenden notwendig werden. — In diesem verschlossenen Zustand sind die Röhrchen eventuell versandfähig. — Zur Serumgewinnung werden dann die Röhrchen in ein für die Zentrifuge passendes Reagenzglas gesetzt, dessen Boden mit etwas Watte bedeckt ist und zentrifugiert. Hierauf werden die mit Siegellack verschlossenen Spitzen der Röhrchen mit dem Glasstahl abgeschnitten und nun an der Grenze von Serum und Blutkuchen ein Strich mit dem Stahl gezogen. An dieser Stelle werden die Röhrchen abgebrochen, ohne daß man zu befürchten braucht, daß das Serum ausläuft, da dasselbe durch Kapillarität festgehalten wird. Sollte, was vorkommen kann, der Blutkuchen so fest an der Wandung des Röhrchens haften, daß er sich nicht zu retrahieren vermag, so ist er mit Hilfe eines dünnen Platindrahts abzulösen, und das Röhrchen nochmals zu zentrifugieren, worauf dasselbe dann, wie eben beschrieben wurde, zersehnitten werden kann. Aus den einzelnen mit Serum gefüllten Röhrchenabschnitten gießt man dasselbe dann direkt in die Meßpipette ein, indem man die horizontal gehaltenen Röhrchen an die nach oben gerichtete Spitze der Pipette anlegt, wobei wieder durch Kapillaritätswirkung jeder Verlust an Serum vermieden wird. Nur ist zu beachten, daß sich in der Ausflußöffnung der Röhrchen kein Luftbläschen befindet, das sonst mit in die Pipette übersteigen würde. Solche Luftbläschen sind übrigens leicht durch Antupfen mit Fließpapier zu entfernen.

2. Verfahren nach Czaplewski[1])-Schottelius.

Czaplewski benutzt zum Auffangen des Blutes nicht die erwähnten dünnen Glasröhrchen, sondern kleine dickwandige, unten spitz zulaufende Zentrifugenröhrchen (Länge

1) Czaplewski, Münch. med. Wochenschr. 1906, S. 508.

5,5 cm, Durchmesser oben 0,8 cm, unten 0,4 cm). Die Röhrchen sind mit gut passendem Kork verschlossen, der von außen nach innen durch eine lange dicke Insektennadel durchbohrt ist. Die Spitze der Nadel wird krallenförmig umgebogen und mit feinster entfetteter und gereinigter Wundwatte umwickelt, so daß ein kleiner Tupfer entsteht. (Mit Holzhülse erhältlich bei THEODOR SCHRÖTER, Leipzig-Connewitz.)

Jeder aus dem Ohrläppchen vorquellende Blutstropfen wird mit dem Wattetupfer aufgefangen, bis dieser vollkommen vollgesogen ist. Darauf werden die Korke sorgfältig aufgesetzt, womit die Röhrchen eventuell zur Versendung bereit sind. Zur Gewinnung des Serums werden die Röhrchen dann zentrifugiert und geben eine überraschend große Ausbeute. Mittels Pipette kann schließlich das Serum aus dem Röhrchen abgezogen werden. — Das Verfahren ist einfacher und erfordert weniger Geschick, als das von PRÖSCHER beschriebene. Zu seiner Ausführung ist, neben den erwähnten Röhrchen nur das Skalpell, Alkohol, Watte und etwas Eisenchloridwatte erforderlich.

G. Gewinnung größerer Mengen menschlichen Blutes.

Die Gewinnung größerer Mengen menschlichen Blutes geschieht nach UHLENHUTH am besten in folgender Weise:

1. Placentarblut: Sobald der Kopf des Kindes im Einschneiden ist, werden unter dem Steiß bis zum Knie der Kreißenden sterile Tücher ausgebreitet. Das Neugeborene wird auf diesen, nachdem die Hände des Geburtshelfers mit ausgekochten Gummihandschuhen versehen sind, abgenabelt und das placentare Ende der Nabelschnur komprimiert. Nachdem der obere Rand eines großen sterilen Zylinderglases in der Flamme abgeglüht ist, wird die Nabelschnur vorsichtig hineingehängt und das in der Placenta befindliche Blut durch Druck auf den Uterus möglichst

hervorgepreßt. Nachem auch das noch in der Nabelschnur befindliche Blut ausgedrückt ist, wird das Glas mit abgesengtem Wattebausch verschlossen. Von jeder Geburt gewinnt man auf diese Weise 20—30 ccm Blut.

2. Als weitere zweckmäßige Art der Blutgewinnung wird angegeben: die Anlegung des Heurteloupschen Schröpfapparates, wie er in der Augenheilkunde benutzt wird (Ausbeute etwa 15 ccm flüssiges Blut), ferner

3. Venäpunktion oder Aderlaß. Zur Ausführung der Venäpunktion wird der Oberarm des Patienten mit einer Gummibinde umwickelt, so daß die Venen anschwellen, die Haut kräftig mit einem in Alkohol getränkten Wattebausch abgerieben und dann in der Ellbogenbeuge eine Vene mit einer Hohlnadel abgestochen. Das abtropfende Blut wird in einem weiten Reagenzglas aufgefangen. Nach Entfernung der Nadel wird die Stichöffnung mit einem Heftpflasterstreifen verschlossen.

4. Endlich ist nach Ziemke auch Leichenblut zu verwenden, wenn es steril gewonnen werden kann.

H. Gewinnung von defibriniertem Blut bzw. von roten Blutkörperchen.

Hierzu eignen sich vor allem jene Methoden der Blutentnahme, bei welchen das Blut rasch und mit vollem Strahl ausfließt, also D, E, G 1 und G 3. Das Blut wird in sterilen mit Glas- oder Porzellanperlen, oder auch mit Stahlopänen beschickten dickwandigen Glasgefäßen (Kolben oder Zylindern, Pulvergläsern usw.) aufgefangen und längere Zeit (mindestens 5 Minuten) kräftig durchgeschüttelt. Man hat darauf zu achten, daß die Gefäße nicht zu voll angefüllt werden. Zum Verschluß derselben nehme man nicht Watte, sondern Kork- oder Kautschukpfropfen.

Um die Blutkörperchen serumfrei zu erhalten, verdünnt man das defibrinierte Blut mit 9 Teilen 0,86%iger Koch-

salzlösung, zentrifugiert, gießt die klare Flüssigkeit ab, ersetzt sie durch die gleiche Menge frischer Kochsalzlösung und zentrifugiert von neuem. Diese Prozedur, das „Waschen der Blutkörperchen" ist im Ganzen dreimal auszuführen.

Man kann übrigens die roten Blutkörperchen auch ohne Defibrinierung des Blutes gewinnen, indem man dasselbe in gerinnungshemmenden Flüssigkeiten auffängt. Also solche können dienen: a) eine $1^1/_2$ %ige Lösung von zitronensaurem Natron, oder b) eine 0,86 %ige Kochsalzlösung, welcher 0,1—0,5 % Kaliumoxalat zugesetzt wurde.

Da manche Sera, besonders solche, die von Kranken oder immunisierten Tieren herstammen, außerordentlich leicht gerinnen, so ist es vorteilhaft, das Blut mit möglichst großen Mengen dieser gerinnungshemmenden Flüssigkeiten in Berührung zu bringen. Man kann z. B. so verfahren, daß man in einen Meßzylinder 9 Teile Flüssigkeit einfüllt, dann bis zum Teilstrich 10 Blut einfließen läßt und nun sofort energisch durchmischt. Durch Zentrifugieren und dreimaliges Waschen mit gewöhnlicher 0,86 %iger NaCl-Lösung wird dann sowohl das Serum (bezw. Plasma) wie die gerinnungshemmende Substanz entfernt.

Konservierung der Sera.

1. Sera normaler Tiere.

Normale Sera, welche nur zu Immunisierungszwecken dienen sollen, bewahrt man am besten in gut verkorkten Arzneifläschchen zu 100—200 g auf. Zur Konservierung setzt man entweder 0,5 % Karbolsäure (i. e. $^1/_{10}$ Volum 5 %iger Karbolsäurelösung) oder 1 % Chloroform oder Toluol zu. Im letzteren Falle hat man von Zeit zu Zeit kräftig umzuschütteln, um die Lösung des Antiseptikums im Serum zu befördern. An der Berührungsstelle des Serums mit dem Chloroform bzw. Toluol bildet sich eine

weißliche trübe Zone, die von gefälltem Eiweiß herrührt, aber meist nicht weiter stört. Die Flaschen sind an einem dunklen und kühlen Orte aufzuheben.

Vor der Verwendung solcher mit Chloroform oder Toluol versetzter Sera kann man die zur Injektion dienende Menge für kurze Zeit in einer offenen flachen Schale in den Brutschrank stellen, um das Konservierungsmittel zur Verdunstung zu bringen. —

In neuerer Zeit ist auch empfohlen worden, zur Konservierung ein Gemisch von 2,0 ccm Formalin und 100 ccm 0,9 %iger Kochsalzlösung zu benutzen. Von dieser Flüssigkeit wird dem Serum im Verhältnis 1 : 4, 1 : 3 oder 2 : 3 zugesetzt[1]).

2. Immunsera.

Immunsera können im flüssigen oder im getrockneten Zustand konserviert werden.

a) Konservierung im flüssigen Zustand, durch Zusatz von Antiseptieis. Agglutinierende Immunsera behalten ihre Wirksamkeit bei Zusatz von 0,3—0,5 % Karbolsäure ziemlich unverändert bei, und werden daher meist in dieser Weise aufbewahrt. — Präzipitierende Immunsera kann man ebenfalls so oder durch Zusatz geringer Toluolmengen konservieren. Nach Uhlenhuth, Weidanz und Wedemann[2]) ist es jedoch zweckmäßiger, dieselben durch ein steriles Berkefeldtsches Filter (s. Fig. 1) zu filtrieren und ohne alle Zutat aufzubewahren.

1) Leers, Methoden und Technik der Gewinnung, Prüfung und Konservierung des zur Eiweißdifferenzierung dienenden Antiserums. Berlin 1908, R. Schoetz.

2) Uhlenhuth, Weidanz u. Wedemann, Arb. aus dem Kaiserl. Ges.-Amt 1908, Bd. XXVIII.

b) Konservierung im flüssigen Zustand, durch keimfreie Filtration. In eine Saugflasche (*b*), die mit einer BERKEFELDTschen Kieselgurkerze (*a*), mittels eines Gummipfropfens in Verbindung steht,

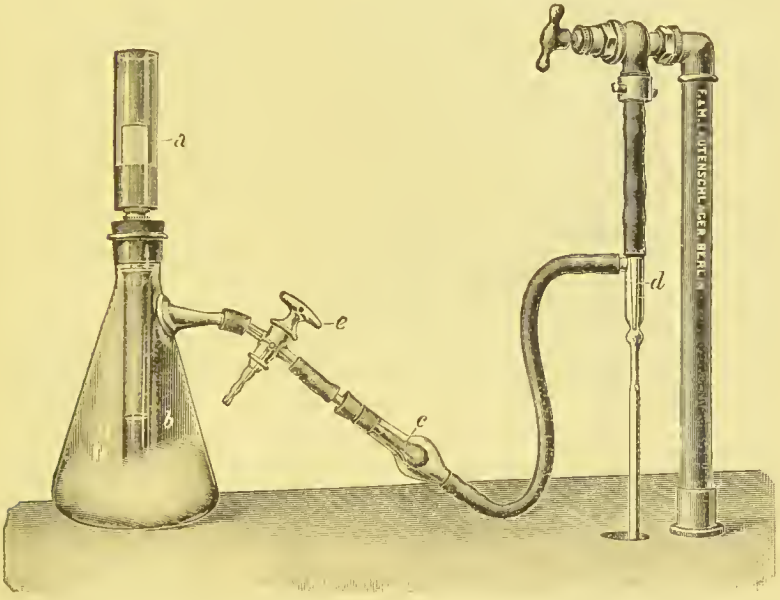

Fig. 1.

wird ein steriles Reagenzglas gestellt, in welches das Serum nach der Filtration hineintropft. Der langausgezogene Ansatz der Saugflasche ist mit der Wasserstrahlpumpe (*d*) durch einen Schlauch, in welchen ein Glashahn *(e)* und ein Rückschlagventil *(c)* eingeschaltet ist, verbunden.

Ist das Serum durchfiltriert, so wird der Kautschukstopfen gelüftet, das Reagenzglas mit einer sterilen Pinzette herausgenommen und mit einem abgebrannten Wattebausch verschlossen. So bleibt es

einige Tage bei Zimmertemperatur stehen, wobei es vollkommen klar bleiben muß, widrigenfalls die Fil-

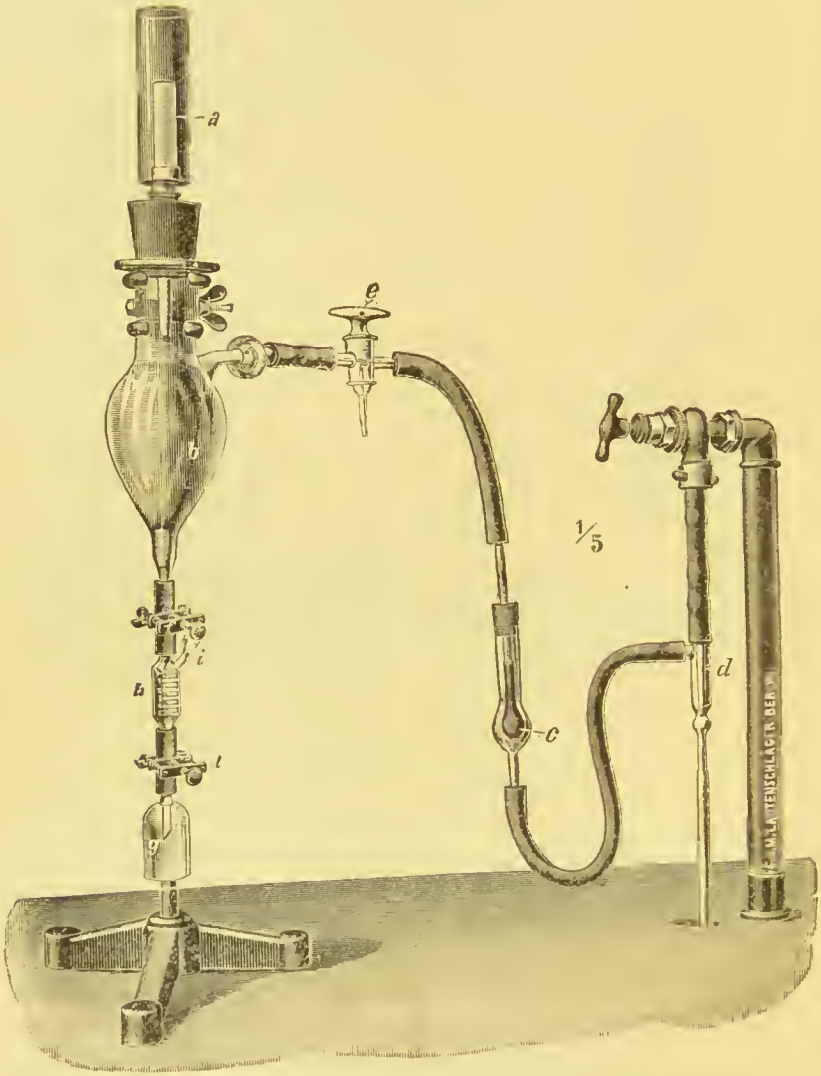

Fig 2.

tration zu wiederholen ist. Hat sich das Serum als steril erwiesen, so wird es mit einer sterilen Pipette in kleine braune Röhrchen zu 1 ccm abgefüllt. Die vorläufig nur mit Watte verschlossenen Röhrchen bleiben dann abermals einige Tage bei Zimmertemperatur stehen, um erst, wenn man sich von dem Klarbleiben ihres Inhalts überzeugt hat, vorsichtig über der Flamme zugeschmolzen zu werden.

Um eine Verunreinigung des Serums, die bei dieser Art der Filtration leicht noch nachträglich eintreten kann, mit absoluter Sicherheit zu verhindern, haben Uhlenhuth und seine Mitarbeiter einen besonderen „Filtrierabfüllapparat" konstruiert, der aus einer Kombination eines Bakterienfilters mit einem Lympheabfülltrichter besteht, und der es gestattet, das filtrierte Serum sofort steril in die kleinen braunen Röhrchen abzufüllen. Der Apparat ist von F. und M. Lautenschläger in Berlin zu beziehen (Fig. 2).

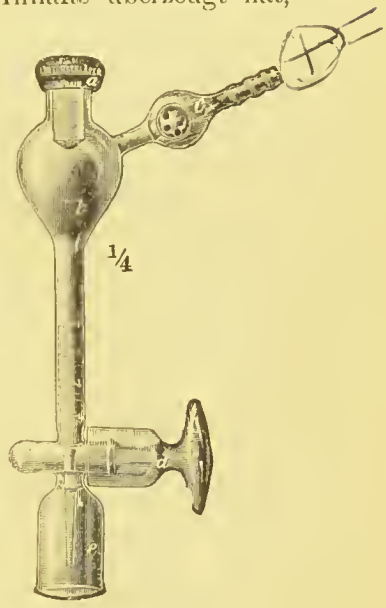

Fig. 3.

Für die Filtration kleinster Flüssigkeitsmengen haben Uhlenhuth und Weidanz einen besonderen „Mikrofiltrierabfüllapparat" angegeben (Fig. 3). Die genaue Beschreibung der Handhabung beider Apparate befindet sich in der eben zitierten Arbeit von Uhlenhuth, Weidanz und Wedemann. —

Das so gewonnene Immunserum ist am besten im Eisschrank, zum mindesten aber vor Wärme

und Licht geschützt aufzubewahren. Ein feiner Niederschlag, der sich manchmal beim längeren Stehen des Serums absetzt, kann, wenn er zufällig vor Gebrauch des Serums aufgeschüttelt wurde, durch Zentrifugieren oder durch neuerliche Filtration entfernt werden. Die Wirksamkeit so konservierter Immunsera kann monate- und jahrelang erhalten bleiben.

c) Konservierung im eingefrorenen Zustand. Da, wo es nicht auf vollkommene Klarheit der Immunsera ankommt, kann man dieselben auch im eingefrorenen Zustand konservieren. Nur in großen, reich ausgestatteten Laboratorien wird ein durch Eismaschinen unter 0° abgekühlter Aufbewahrungsraum zur Verfügung stehen. Für kleinere Laboratorien eignet sich der von MORGENROTH angegebene von F. und M. Lautenschläger in Berlin ausgeführte Gefrierapparat „Frigo", der übrigens auch zur Not improvisiert werden kann. Zu diesem Zweck stellt man in eine große Holzkiste einen mehrere Liter fassenden Kochtopf, füllt den Raum um diesen herum fest mit Sägespänen aus und stellt dann mitten in den Kochtopf, als Behältnis für die kleinen Serumfläschchen, eine verschließbare Blechbüchse. In den Topf kommt außerdem noch Eis oder Schnee und Viehsalz, so daß eine Kältemischung entsteht, die sich, wenn die Kiste nach oben mit einer mehrfachen Filzlage bedeckt wird, einige Tage hält und dann erneuert werden muß.

Beim Gefrieren der Sera bilden sich häufig Trübungen und Fällungen.

d) Konservierung im getrockneten Zustand. Das Serum kann in möglichst dünner Schicht auf großen Glasplatten ausgebreitet und zum Trocknen in den Brutschrank gebracht werden. Nach

einigen Stunden wird das dem Glas nur ganz loeker anhaftende trockene Serum mittels eines Spatels abgehoben und in einem zugesehmolzenen luftleeren Röhrehen aufbewahrt.

Zweckmäßiger ist es jedoeh die Eintroeknung im Vakuum vorzunehmen. Die großen Seruminstitute benutzen zu diesem Zweek eigens gebaute Serumtroekenapparate. In kleineren Instituten reicht man aber mit den gewöhnliehen Vakuumapparaten aus. Den einfaehsten Trockenapparat kann man sieh naeh Taege[1]) in folgender Weise herstellen. Eine abgesehliffene Glasgloeke mit einer großen Öffnung am oberen gewölbten Teile wird auf eine polierte Eisenplatte aufgesetzt, die dureh einen Gasbrenner erwärmt werden kann oder auf einem Wasserbade aufruht. Die obere Öffnung der Gloeke wird dureh einen dreifaeh durehbohrten Gummistopfen versehlossen. Die eine Bohrung ist für die Aufnahme des Thermometers bestimmt, dureh die zweite geht der Stutzen eines Manometers, durch die dritte endlich ein gebogenes Glasrohr, das durch einen diekwandigen Sehlaueh mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden wird. —

Das getroeknete Serum ist dann vor dem Gebraueh in physiologischer Koehsalzlösung aufzulösen.

Da es sieh bei Anstellung der biologisehen Reaktionen häufig um Verwendung minimaler Serummengen handelt, deren exakte Abwägung Sehwierigkeiten maehen kann, so ist es nach Leers[2]) einfacher und bequemer, die zu einer Probe dienenden Einzeldosen des Antiserums auf Papier anzutroek-

1) Münch. med. Wochenschr. 1908, No. 33.

2) Methoden und Technik der Gewinnung, Prüfung und Konservierung des zur forensischen Blutdifferenzierung dienenden Antiserums. Berlin 1908, R. Schoetz.

nen. Das Papier muß, um ein Durchsickern der Tropfen zu verhindern, von ziemlicher Stärke sein; zweckmäßig ist schwarzes Naturpapier zu verwenden. Mit einer graduierten Pipette wird je 0,1 ccm des Serums in einem großen Tropfen auf das in kleine Stücke geschnittene Papier gesetzt. Nach 2- bis 4stündigem Aufenthalt im Brutschrank ist der Tropfen zu einer festen glänzenden, am Papier haftenden Kruste eingetrocknet, worauf die einzelnen Serumdosen im Exsikkator vor Licht, Wärme und Feuchtigkeit geschützt aufbewahrt werden. Das so konservierte Antiserum kann seine Wirksamkeit sehr lange unverändert beibehalten.

Zur Anstellung der Reaktion wird das Stückchen Papier, das die Einzeldosis des Serums enthält, kurz mit Kochsalzlösung abgespült, um Staub und Faserteilchen zu entfernen, und dann in eine gemessene Menge Kochsalzlösung (bezw. direkt in die zu untersuchende Eiweißlösung) eingebracht, wobei die Papierseite zunächst der Flüssigkeit aufliegen soll. Hat sich das Papierchen vollgesogen, so sinkt es von selbst zu Boden oder man kann dasselbe dann auch direkt untertauchen; hingegen soll man vermeiden das Papier sofort unter Wasser zu bringen, da dann die Luft aus den Maschenräumen des Papiers nicht völlig verdrängt wird, was die Lösung des Serums beeinträchtigt.

Bei der Auswahl des zur Antrocknung dienenden Papiers ist noch darauf zu achten, daß es innerhalb der zur Auflösung des Serums notwendigen Zeit nicht zu viel Farbe an die Flüssigkeit abgeben darf.

e) Konservierung im Tierkörper selbst. Unter Umständen kann es vorteilhaft sein, von dem immunisierten Tier nur soviel Serum zu entnehmen, als eben unbedingt zur Anstellung der Reaktion be-

nötig wird, und das Tier am Leben zu lassen. Man kann dasselbe dann von Zeit zu Zeit neuerdings injizieren, oder es aber auch ruhen lassen. Wird dann wieder Serum gebraucht, so gelingt es meist, durch eine oder zwei neuerliche Einspritzungen den Serumtiter rasch wieder auf die erforderliche Höhe zu bringen. Einen Nachteil dieses Verfahrens bildet die große Empfindlichkeit immunisierter Tiere, welche leicht erkranken oder unter anaphylaktischen bezw. marantischen Erscheinungen zugrunde gehen können. Man müßte deshalb stets eine größere Zahl derselben vorrätig halten, was aber natürlich mit einer bedeutenden Erhöhung der Kosten verbunden ist.

Technik der serodiagnostischen Methoden.

I. Präzipitinreaktion.

Prinzip: Beim Vermischen hochwertigen Immunserums mit seinem eiweißartigen Antigen in passenden Mengenverhältnissen entstehen spezifische Niederschläge.

Verwendung: Zum Nachweis von Eiweißkörpern fraglicher Provenienz, Unterscheidung von Menschen- und Tierblut (nach Uhlenhut), Nachweis von Fleischverfälschungen usw. Zur Serodiagnostik der Syphilis.

Anwendungen.

A. Unterscheidung von Menschen- und Tierblut bzw. Eiweiß.

Hierzu sind erforderlich:

a) Ein hochwertiges, vollkommen spiegelklares Immunserum gegen die nachzuweisende Eiweiß-

art. Dasselbe wird am besten durch intravenöse oder intraperitoneale Injektion einer größeren Anzahl von Kaninchen mit Blut oder noch besser Serum gewonnen, wobei die Einspritzungen vier- bis fünfmal in Intervallen von 5—6 Tagen wiederholt werden.

Man erhält nun nicht von allen Kaninchen, die mit fremdartigem Blut oder Serum injiziert wurden, ein geeignetes hochwirksames Immunserum. Man muß daher von der dritten Injektion an eine wiederholte Probeblutentnahme (2—3 ccm) aus der Ohrvene vornehmen, um die Brauchbarkeit des Serums zu prüfen. Entspricht dasselbe dann den gleich anzugebenden Bedingungen, so wird das Kaninchen getötet und das Serum gewonnen. Dieses muß nun folgende Eigenschaften haben:

Es muß absolut klar sein, was man durch Filtration durch ein sterilisiertes Berkefeldt-Filter erreichen kann. Ferner darf es, gegen das Licht gehalten, keine milchige Opaleszenz besitzen; da sich diese — vom Verdauungszustand des Tieres abhängige — Opaleszenz nicht wie die Trübungen des Serums durch Filtration beseitigen läßt, so ist ein opaleszentes Serum auf jeden Fall als unbrauchbar zu betrachten. Tiere, die bei der Probeentnahme Opaleszenz aufweisen, sind daher erst zu töten, wenn dieselbe wieder verschwunden ist, was nach mehrstündigem Hungernlassen der Fall zu sein pflegt.

Endlich muß das Serum hochwirksam sein und prompt reagieren. Um sich hiervon zu überzeugen, wird nach der Probeentnahme bzw. nach der definitiven Fertigstellung des Serums eine genaue Titerbestimmung vorgenommen und zwar in der gleichen Weise, wie sie später bei der Ausführung der eigentlichen Reaktion beschrieben werden wird. Es sollen daher hier nur die Mengenverhältnisse der reagierenden Substanzen, die für diesen speziellen Zweck einzuhalten sind, angegeben werden:

Mit physiologischer (0,8—0,9 %iger) Kochsalzlösung werden von der betreffenden Blut- bzw. Serumart, gegen welche sich das Immunserum richtet, Verdünnungen von 1 : 1000, 1 : 10 000 und 1 : 20 000 hergestellt, und zu je 2 ccm dieser letzteren je 0,1 ccm Antiserum, ohne zu schütteln, zugesetzt. In der Lösung 1 : 1000 muß momentan oder spätestens nach 1—2 Minuten deutliche Trübung auftreten, nach 3—5 Minuten muß auch in den stärkeren Verdünnungen die beginnende Reaktion deutlich erkennbar sein, und nach spätestens 30 Minuten (bei Zimmertemperatur) muß die Reaktion als vollkommen abgeschlossen betrachtet werden können.

Da man durch die Filtration durch sterilisierte Berkefeldt-Filter, wenn das Filter tadellos funktioniert (Sprünge in der Filtermasse!), keimfreies Serum erhält, so kann man dasselbe direkt, in sterile Glasröhrchen eingeschmolzen, aufbewahren.

Sicherer ist es jedoch, dasselbe, wie nicht filtriertes Serum, durch Zusatz von $^1/_2$ % Karbolsäure ($^1/_{10}$ Volum 5 %iger Karbolsäurelösung) zu konservieren.

b) Eine Lösung der zu untersuchenden Substanz. Als Lösungsmittel (von Blutflecken usw.) ist ausschließlich physiologische Kochsalzlösung zu verwenden. Der Verdünnungsgrad des Blutes soll etwa 1 : 1000 sein, was bei Blutspuren allerdings nicht immer leicht zu erreichen ist. Als Orientierung für den passenden Verdünnungsgrad ist nach Uhlenhuth zu benutzen:

1. Die fast vollkommene Farblosigkeit der Lösung bei durchfallendem Licht.
2. Die Lösung darf bei der Kochprobe unter Zusatz von einigen Tropfen Salpetersäure nur eine ganz leichte Trübung geben.
3. Sie muß beim Schütteln, trotz der starken Verdünnung, noch starke Schaumbildung zeigen.

Auch diese Lösung muß spiegelklar sein und ist eventuell zu filtrieren.

c) Reagenzgläser von etwa 10 cm Länge und 0,9 — 1,0 cm Durchmesser. Dieselben müssen absolut sauber sein.

d) Ein Reagenzglasgestell. Zweckwäßig ist das von Uhlenhuth angegebene Gestell für 12 Röhrchen, welche mit ihrem oberen, stark nach außen gebogenen Rand in den Löchern des Gestells hängen bleiben. Da die kleinen Röhrchen oft ungleichen Durchmesser besitzen, ist es ratsam, sich vorher möglichst gleichstarke Röhrchen auszusuchen. Um Verwechslungen zu vermeiden, sind die einzelnen Löcher auf dem Gestell mit Nummern versehen (Abb. 4).

e) Physiologische Kochsalzlösung.

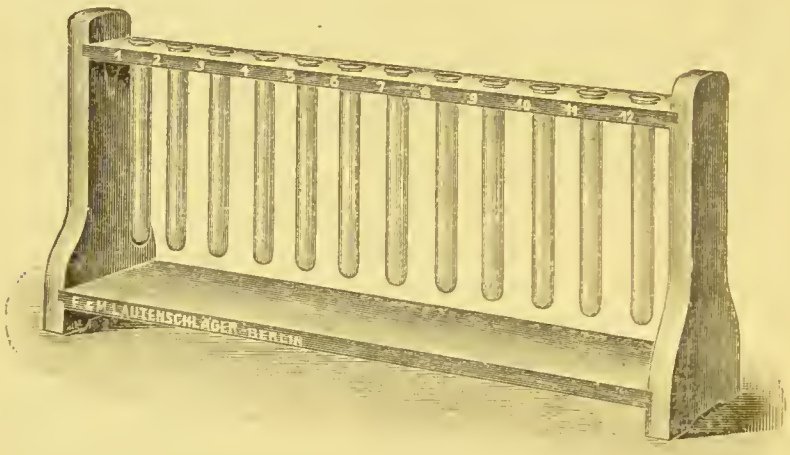

Fig. 4.

f) Meßpipetten (Inhalt 0,1 ccm) in $^1/_{100}$ ccm geteilt (Teilung bis zur Spitze reichend!) und solche mit 1,0 und 10,0 ccm Inhalt, in $^1/_{10}$ ccm geteilt.

g) Getrocknete Blutproben verschiedener Tierspezies zur Anlegung der Kontrollen. — (Es wird genau, wie von

der zu untersuchenden Substanz, eine Lösung von etwa 1 : 1000 hergestellt.)

Ausführung.

In eine Reihe von Reagenzröhrchen kommen folgende Flüssigkeiten:

1. (Eigentliche Hauptreaktion): 2 ccm der fraglichen Blutlösung + 0,1 ccm Immunserum.
2. (Kontrolle): 2 ccm Kochsalzlösung + 0,1 ccm Immunserum.
3. (Kontrolle): 2 ccm Blutlösung jener Art, die man in der zu untersuchenden Blutprobe nachweisen will + 0,1 ccm Immunserum.
4. (Kontrolle): 2 ccm der fraglichen Blutlösung für sich allein.
5. (Kontrolle): 2 ccm Blutlösung anderer Tierspezies + 0,1 ccm Immunserum.

Wenn die Hauptreaktion und Kontrolle 3 positiv ausfällt, alle anderen Proben dagegen negativ, so ist die Anwesenheit der betreffenden Blut- bzw. Eiweißart in der fraglichen Probe erwiesen. Ist das Ergebnis negativ, so muß mit Hilfe anderer Antisera in vollkommen analoger Weise ermittelt werden, welcher Tierspezies der Blutprobe angehört.

Auch hier muß, bei positivem Ausfall der Probe, spätestens 1—2 Minuten nach Zusatz des Antiserums der Beginn der Reaktion als hauchartige Trübung am Boden des Röhrchens sichtbar sein, innerhalb der ersten 5 Minuten muß sich dieselbe (bei Zimmertemperatur) in eine dicke wollige Trübung verwandelt haben und in den nächsten 10 Minuten bereits einen deutlichen Bodensatz gebildet haben.

Später als nach 20 Minuten auftretende Trübungen sind nicht mehr zu berücksichtigen. Ferner ist noch zu bemerken, daß die Röhrchen nicht geschüttelt werden dürfen.

Stehen nur sehr geringe Substanzmengen zur Verfügung, so kann man die Reaktion nach Hauser auch in feinsten, sauber gereinigten Kapillaren vornehmen. Man attrahiert ein Tröpfchen der zu prüfenden Blutlösung und unterschichtet mit einer winzigen Menge des spezifischen

Serums, soviel eben in dem Röhrchen durch Kapillarität noch aufzusteigen vermag. An der Berührungsstelle der beiden Flüssigkeiten bildet sich dann ein deutlicher grauweißer Ring.

Wird die Reaktion in der eben beschriebenen Weise ausgeführt, so entstehen keine heterologen Trübungen; dieselbe ist also streng spezifisch, wie Nutall auf Grund von Erfahrungen bei 16 000 Blutreaktionen bestätigen konnte. Nur bei sehr nahe verwandten Tierspezies — Pferd und Esel, Schaf und Ziege, Hund und Fuchs — kann die Unterscheidung zweifelhaft sein, während Rinderblut von Schafblut wohl zu differenzieren ist.

Auch bei hochgradig gefaulten oder jahrelang eingetrocknetem Blute kann die Reaktion noch gelingen.

Da dieselbe eine Eiweißreaktion ist, so wird sie nicht nur von Blut, sondern auch von anderen eiweißhaltigen Substanzen, von Sperma, Eiter, eitrigem Sputum und Urin usw. gegeben, was in der gerichtsärztlichen Praxis wohl zu berücksichtigen ist.

Hierauf beruht auch die Anwendbarkeit der Präzipitinreaktion zum Nachweis von Fleischverfälschungen.

B. Nachweis von Fleischverfälschungen.

Technik nach Uhlenhuth, Weidanz und Wedemann[1]).

Hierzu sind erforderlich:

a) Wirksames Antiserum gegen jene Eiweißart, welche in der betreffenden Fleischprobe nachgewiesen werden soll. Meist wird es sich dabei um den Nachweis von Pferdeeiweiß handeln.

Das Serum wird dementsprechend von Kaninchen gewonnen, die mit defibriniertem Pferdeblut oder besser

1) Arbeiten aus dem Kaiserl. Ges.-Amt 1908, Bd. XXVIII.

noch mit Pferdeserum immunisiert wurden. Die Tiere werden am besten intravenös injiziert und zwar jeden fünften Tag mit Mengen von 2—3 ccm. Etwa 5 bis 6 Tage nach der dritten Einspritzung wird aus der Obervene etwas Blut entnommen und das sich abscheidende Serum auf seine Wirksamkeit geprüft Diese vorläufige Prüfung geschieht in der Weise, daß man 1 ccm einer im Verhältnis 1 : 1000 hergestellten Lösung von Pferdeserum in 0,85%iger Kochsalzlösung mit 0,1 ccm des vollkommen klaren und nicht opaleszierenden Antiserums ohne Schütteln zusammenbringt. Tritt sofort oder spätestens nach 1—2 Minuten eine am Boden des Röhrchens beginnende Trübung auf, so entspricht das Antiserum den Anforderungen, und das Tier kann zum Zweck der Blutgewinnung getötet werden.

Von einer größeren Anzahl derartig immunisierter Tiere wird jedoch nur ein kleiner Teil schon nach der dritten Einspritzung ein brauchbares Serum liefern. Diejenigen Kaninchen, die zwar deutlich Präzipitine, aber in unzureichender Menge gebildet haben, werden am besten intraperitoneal oder subkutan weiter injiziert; diejenigen dagegen, welche nach der dritten Einspritzung noch keine Präzipitine aufweisen, können intravenös weiter behandelt werden und liefern bisweilen erst nach Einverleibung von im ganzen 60—120 ccm Serum ein wirksames Immunserum.

Das Immunserum muß folgende Bedingungen erfüllen:

1. muß es absolut klar und steril sein, was durch Filtration durch ein Berkefeldtsches Filter erreicht wird;
2. darf es nicht opaleszieren. Um Opaleszenz zu vermeiden, soll man die Tiere einige Zeit vor der Blutentnahme hungern lassen;
3. muß es hochwirksam sein.

Die Prüfung des filtrierten Serums auf seine Wirksamkeit geschieht genau wie bei A, S. 21, beschrieben. Sein Titer muß 1 : 20 000 sein, d. h. es muß in einer Lösung von Pferdeblutserum, die im Verhältnis 1 : 20 000 hergestellt ist, binnen 5 Minuten beginnende Trübung erzeugen. Derartiges Antipferdeserum ist bis auf weiteres vom Kaiserlichen Gesundheitsamt in Berlin erhältlich.

b) Ein Extrakt aus der zu untersuchenden Fleischprobe. Zur Herstellung des Extrakts werden aus der Tiefe des verdächtigen Fleischstückes von einer frisch hergestellten Schnittfläche etwa 30 g Muskelfleisch, möglichst ohne Fettgewebe mit Hilfe eines ausgeglühten oder ausgekochten Messers entnommen. Die Entnahme und Zerkleinerung des Materials ist auf einer absolut sauberen, ausgekochten, mit ungebrauchtem Schreibpapier bedeckten Unterlage, eventuell mit einem ausgekochten Wiegemesser, vorzunehmen. Die zerkleinerte Fleischmasse wird in ein sterilisiertes, ca. 100 ccm fassendes Erlenmeyer-Kölbchen gebracht, mit Hilfe eines sterilisierten Glasstabes gleichmäßig verteilt und mit 50 ccm steriler 0,85 %iger Kochsalzlösung (nicht Brunnenwasser oder destilliertes Wasser!) übergossen. Gesalzenes Fleisch kann man zuvor in einem größeren sterilen Erlenmeyer-Kolben entsalzen, indem man es mit sterilem destillierten Wasser übergießt und letzteres ohne Schütteln während 10 Minuten mehrmals erneuert.

Das Gemisch von Fleisch und Kochsalzlösung bleibt 3 Stunden bei Zimmertemperatur oder über Nacht im Eisschrank stehen. Zur Beschleunigung der Lösung, besonders bei fettem Fleisch, ist Zusatz einiger Tropfen Chloroform zu empfehlen. Um sich davon zu überzeugen, daß in dem Extrakt bereits eine genügende Menge von Eiweißkörpern enthalten ist, werden etwa

2 ccm desselben in ein Reagenzglas gegossen und stark geschüttelt. Entwickelt sich dabei ein feinblasiger Schaum, der längere Zeit bestehen bleibt, so ist der Auszug verwendbar.

Zunächst muß derselbe aber vollkommen klar filtriert werden, was bei magerem und frischem Fleisch bereits nach einmaliger Filtration durch ein gehärtetes, mit Kochsalzlösung angefeuchtetes Papierfilter (Schleicher und Schüll, Nr. 575, 603 oder 605) gelingt. Bei Extrakten aus fettem oder gepökeltem Fleisch filtriert man besser durch ausgeglühte Kieselgur.

Man verfährt dabei folgendermaßen. Die ausgeglühte Kieselgur wird mit steriler 0,85 %iger Kochsalzlösung zu einem dünnen Brei verrührt. Dieser wird in ca. 2 mm dicker Schicht gleichmäßig auf die Filterplatte eines Buchnerschen Trichters (eine Art Nutsche) verteilt, welche vorher sorgfältig mit Filtrierpapier bedeckt wurde, um ein Hindurchfließen der Filtermasse zu verhindern. Die übrige Anordnung des Apparates ist ganz so wie auf S. 13 beschrieben. Mit Hilfe der Saugpumpe kann man dann sehr rasch ein klares Filtrat erhalten. An Stelle dieses Kieselgurbreies kann man übrigens auch die freilich viel teueren Berkefeldtschen Kieselgurfilter benutzen, die natürlich vor jedesmaligem Gebrauch zu sterilisieren sind.

Hat man ein klares Filtrat erhalten, so muß dasselbe eventuell weiter verdünnt werden, wenn es mehr als 1 Teil Fleischeiweiß in 300 Teilen Kochsalzlösung enthält. Um dies zu ermitteln, wird 1 ccm des Filtrates in einem kleinen Reagenzröhrchen gekocht und mit einem Tropfen der offizinellen Salpetersäure (spez. Gew. 1,153) versetzt. Tritt eine starke Trübung auf, die sich sofort als flockiger Niederschlag zu Boden senkt, so ist dies ein Zeichen, daß die Lösung noch zu stark ist und das Filtrat noch weiter verdünnt

werden muß. Erst wenn man jenen Punkt erreicht hat, wo auf Zusatz der Salpetersäure eine gleichmäßig opaleszierende Trübung entsteht, die sich nach etwa 5 Minuten als eben erkennbarer Niederschlag zu Boden senkt, besitzt die Lösung die gewünschte Konzentration.

Vor Ansetzen des Versuchs ist dieselbe mit Lackmuspapier noch auf ihre Reaktion zu prüfen, die neutral oder nur schwach sauer oder alkalisch sein muß. Um beim eventuell notwendig gewordenen Neutralisieren einen Überschuß von Alkali mit Sicherheit auszuschließen, kann man an Stelle löslicher Alkalien zweckmäßig Magnesiumoxyd verwenden. —

Fig. 5.

c) Zur Kontrolle dienen wie oben hergestellte Extrakte von Schweine- und Rindfleisch.

d) Vollkommen klares, normales Kaninchenserum.

e) Physiologische Kochsalzlösung.

f) Meßpipetten zu 1 ccm, in $^1/_{10}$ ccm geteilt; steril.

g) Eventuell Kapillarpipetten (Fig. 5), die man sich durch Ausziehen eines Glasrohres von 5 mm Durchmesser über einer Gebläselampe herstellen kann. Man kalibriert dieselben, indem man aus einer dünnen genau geeichten Pipette 0,1 ccm Kochsalzlösung in ein Uhrschälchen bringt, die Flüssigkeit dann mit der Kapillarpipette aufsaugt, dann langsam wieder abtropfen läßt und die Tropfen zählt. Die Anzahl der Tropfen entspricht dann etwa 0,1 ccm.

h) Reagenzgläser von etwa 10 cm Länge und 0,9 bis 1,0 cm Durchmesser.

i) Ein Reagenzglasgestell.

Hat man das Antiserum in kleinen Röhrchen eingeschmolzen aufbewahrt, so darf zu einer Untersuchung stets

nur der Inhalt eines Röhrchens verwendet werden, wenn man nicht sicher ist, daß das Serum eines anderen Röhrchens von demselben Kaninchen stammt. Denn beim Vermischen der Antisera verschiedener Tiere können Fällungen auftreten, die zu Irrtümern Veranlassung geben können.

Hat sich in dem längere Zeit aufbewahrten Antiserum ein Niederschlag abgesetzt, so darf dieselbe nicht aufgewirbelt werden, sondern das klare darüberstehende Serum ist mit der Kapillarpipette vorsichtig abzusaugen.

Zum Einfüllen der verschiedenen Lösungen sind jedesmal frische, sterilisierte Pipetten zu verwenden. Das Kaninchenserum wird vorsichtig derart mit Hilfe der Kapillarpipette zugesetzt, daß es an der Wand des Röhrchens herabfließt und sich auf seinem Boden ansammelt. Die Röhrchen bleiben bei Zimmertemperatur stehen und sollen nicht geschüttelt werden.

Ausführung.

Es werden folgende Proben aufgestellt:

Röhrchen	1 : 1	ccm	fragliches Extrakt	+	0,1	ccm	Antipferdeserum
„	2 : 1	„	„	„	+ 0,1	„	normales Kaninchenserum
„	3 : 1	„	Pferdefl.-Extr.	+	0,1	„	Antipferdeserum
„	4 : 1	„	Schweinefl.-Extr.	+	0,1	„	„
„	5 : 1	„	Rindfl.-Extr.	+	0,1	„	„
„	6 : 1	„	sterile Kochsalzlös.	+	0,1	„	„

Tritt in Röhrchen 1 und 3 nach etwa 5 Minuten eine hauchartige, meist am Boden des Röhrchens beginnende Trübung auf, die sich innerhalb weiterer 5 Minuten in eine wolkige umwandelt und nach spätestens 30 Minuten unten als Bodensatz absetzt, während die übrigen Proben klar bleiben, so handelt es sich um Pferdefleisch bzw. anderes Einhuferfleisch (vgl. S. 24). Später entstehende Trübungen sind nicht als positive Reaktionen aufzufassen. Zur besseren Feststellung der zuerst eintretenden Trübung können die

Röhrchen bei auffallendem Tages- oder bei künstlichem Licht betrachtet werden, indem hinter das Reagenzglas schwarzes Papier oder dergleichen geschoben wird.

C. Luesdiagnose nach Fornet und Schereschewsky[1]).

Prinzip: Serum von Tabikern und Paralytikern gibt mit dem Serum von Luetikern positive Präzipitinreaktion.

Hierzu sind erforderlich:

a) Vollkommen klares Serum eines Tabikers oder Paralytikers. (Blutentnahme am besten frühmorgens.) Eventuell durch Papier No. 602 von Schleicher und Schüll zu filtrieren;

b) klares Serum des fraglichen Luetikers. Wie a gewonnen und behandelt. Konserviert können die Sera werden durch Zusatz von Formalin 1 : 10 000 oder durch Einschmelzen in dünne (sterile) Glasröhrchen;

c) zur Kontrolle Serum eines sicher luetischen und eines sicher nicht luetischen Individuums:

d) Röhrchen von 8 cm Höhe und 0,5 cm Weite. Dieselben stehen zweckmäßig in einem schwarzen Holzgestell, an dessen Rückseite ein schwarzer Tuchstreifen verschiebbar ist;

e) Pipetten zu 1,0 ccm, in $^1/_{100}$ geteilt.

Ausführung.

Man stellt sich von a und b Verdünnungen 1:5 und 1 : 10 her, ebenso von den unter c aufgeführten Kontrollseren. Hierauf werden je 0,15—3 ccm des Serums a (bzw. der daraus hergestellten Verdünnung) mit Serum b (bzw. der daraus hergestellten Verdünnung) über- resp.

1) Deutsche med. Wochenschr. 1907, No. 41. Münchner med. Wochenschr. 1907, No. 30.

unterschichtet, indem man mit Hilfe der Pipette zuerst die spezifisch schwerere (d. i. weniger stark verdünnte) Flüssigkeit in die Reagenzröhrchen einbringt und dann, unter Schrägstellung der letzteren, die spezifisch leichtere Flüssigkeit einfließen läßt.

Man hat demnach folgende Kombinationen:

a + b	a (5 f.) + b	a (10 f.) + b
a + b (5 f.)	a (5 f.) + b (5 f.)	a (10 f.) + b (5 f.)
a + b (10 f.)	a (5 f.) + b (10 f.)	a (10 f.) + b (10 f.)

Ebenso werden die Kontrollen c mit den Verdünnungen von a unter- bzw. überschichtet. Proben, bei denen die Schichtung nicht vollkommen gelang, sind zu verwerfen.

Nach höchstens zweistündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur zeigt sich bei positivem Ausfall ein feiner Ring an der Grenze der Flüssigkeiten, der besonders deutlich wird, wenn man das direkt einfallende Tageslicht noch durch ein schräg hinter die Gläschen gehaltenes schwarzes Papier abblendet. Die Kontrollen mit dem nicht luetischen Serum müssen negativ, die mit dem sicher luetischen Serum positiv ausfallen, wenn die Reaktion beweisend sein soll.

II. Ausflockungsreaktionen.

Prinzip. Das Blutserum gibt bei gewissen Infektionskrankheiten, besonders bei Lues, mit kolloidalen Lösungen von Lezithin, von Natrium glycocholicum usw. flockige Fällungen.

Anwendungen.

A. Luesdiagnose nach Porges und Meier[1]).

Hierzu sind erforderlich:

1. Serum des Patienten im Verhältnis 1 : 5 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt (1—2 ccm). Ferner

1) Berl. klin. Wochenschr. 1908, No. 15.

ebensolche Verdünnungen von sicher normalem und von sicher luetischem Serum, die zur Kontrolle dienen sollen.

2. Lezithin (Kahlbaum), das mit der 100 fachen Menge von physiologischer Kochsalzlösung zu einer 1 %igen Stammsuspension verrieben und bis zur Homogenität zerschüttelt wird. Zur Konservierung ist 0,5 % Karbolsäure zuzusetzen. Diese Suspension ist noch nach Wochen wirksam.
3. Enge Röhrchen von 5—7 mm Durchmesser.
4. Pipetten zu 1 ccm, in $^1/_{10}$ ccm geteilt.

Ausführung.

1 ccm der Serumverdünnung wird mit 0,2 ccm der Lezithinsuspension gemischt und für einige Stunden in den Brutschrank gebracht. Das Resultat der Reaktion ist eine in der ganzen Flüssigkeitssäule diffus auftretende, anfangs sehr feine, dann immer gröber werdende Flockenbildung, die bei stark wirkenden Seris zur Bildung eines Niederschlages führt, während sich die obenstehende Flüssigkeit mehr oder minder klärt. Der Eintritt der Reaktion kann sofort erfolgen, ist aber in der Regel erst nach $^1/_2$ bis 24 Stunden erkennbar. Auf Zuhilfenahme der Lupe bei Betrachtung des Niederschlags ist im allgemeinen zu verzichten.

Die mit normalem Serum angestellte Kontrollprobe muß natürlich vollkommen klar bleiben. — Die Methode scheint meist dasselbe Resultat zu liefern, wie das Verfahren der Komplementablenkung.

B. Luesdiagnose nach Elias, Neubauer, Porges und Salomon[1].

Hierzu sind erforderlich:

a) Inaktiviertes Serum des betreffenden Patienten, und zwar ca. 0,5 ccm. Dasselbe muß vollkommen

1) Berl. klin. Wochenschr. 1908, No. 23.

klar sein. Zur Kontrolle normales und sicher luetisches Serum.

b) Frisch bereitete 1 % ige Lösung von Natrium glycocholicum (Merck).

c) Kleine Reagenzröhrchen von 6—7 mm Durchmesser.

d) Pipetten zu 1 ccm Inhalt, in $^1/_{10}$ ccm geteilt.

Ausführung.

Je 0,2 ccm Serum und Lösung von Natriumglykocholat werden gemischt und, vor gröberen Erschütterungen geschützt, 16—20 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach dieser Zeit haben sich bei positiver Reaktion Flocken gebildet, die sich meist an der Oberfläche der Flüssigkeit zusammenballen. Trübungen oder Spuren von Flockungen sind als negativ anzusehen. Unzulässig sind folgende Modifikationen:

1. Schichtung der beiden reagierenden Substanzen; in diesem Falle zeigt sich immer eine ringförmige Trübung.
2. Anwendung von Bruttemperatur (Bakterienwachstum!).
3. Benutzung nicht frisch bereiteter Lösung.
4. Zusatz von Karbol zur Lösung des gallensauren Salzes.
5. Verwendung von inhomogen trüben und sehr stark hämoglobinhaltigen Seris.
6. Benutzung besonderer Hilfsmittel zur Beurteilung der Reaktion, wie Lupe oder seitliche Beleuchtung. Die Reaktion ist nur bei deutlichen makroskopisch sichtbaren Flocken als positiv zu betrachten. — Die Methode scheint meist dasselbe Resultat zu geben, wie das Verfahren der Komplementablenkung.

C. Luesdiagnose nach Klausner[1]).

Hierzu sind erforderlich:

a) Blutserum des betreffenden Patienten, und zwar ca. 1 ccm.

1) Wiener klin. Wochenschr. 1908, No. 7.

b) Kleine Reagenzröhrchen von 1,5—7 mm Durchmesser.
c) Pipetten zu 1,0 ccm, in $^1/_{10}$ ccm geteilt.
d) Destilliertes Wasser.

Ausführung.

Je 0,2 ccm des Serums, sowie auch der 5- und 10-fachen Serumverdünnung werden mit 0,7 ccm destillierten Wassers versetzt, gut durchgemischt und bei Zimmertemperatur 2 bis höchstens 15 Stunden stehen gelassen. Nach dieser Zeit findet sich, wenn das Serum von Luetikern stammt, am Boden der Röhrchen eine 2—4 mm hohe Globulinfällung, die manchmal noch zum Teil in Form deutlich sichtbarer Flocken in der Flüssigkeit schwimmt. Die Reaktion scheint nicht spezifisch zu sein!

III. Agglutinationsreaktionen.

Prinzip: Wird eine homogene, d. i. gleichmäßig trübe Bakterienaufschwemmung mit homologem Immunserum versetzt, so treten nach einiger Zeit Fällungen in dem Gemisch auf, welche aus aneinander haftenden Bakterien bestehen und sich langsam unter Klärung der überstehenden Flüssigkeit zu Boden senken. Bewegliche Arten stellen dabei ihre Bewegungen ein.

Anwendungen.

A. Agnoszierung einer fraglichen, aus Dejekten, Wasser usw. isolierten Bakterienart (Gruber-Durhams Reaktion).

(Bei Typhus, Paratyphus, Cholera, Dysenterie, Pest, Meningokokken usw.

1. Im Reagenzglas angestellt.

Hierzu sind erforderlich (Verfahren nach Pröscher[1]):

a) Eine homogene Aufschwemmung der betreffenden zu agnoszierenden Bakterienart; dazu eignet sich in

1) Pröscher, Zentralbl. f. Bakt. 1902, Bd. XXXI.

vielen Fällen eine 12—24stündige Bouillonkultur. Häutchen- oder bodensatzbildende Arten dagegen werden besser auf schrägem Agar bei 37 ° C gezüchtet und der Bakterienrasen dann, nach 12—24 Stunden, mit Hilfe einer Platinöse in wenig Bouillon (2—5 ccm) möglichst gleichmäßig verteilt. (Verreiben an der Wand des Reagenzröhrchens, Absitzenlassen der gröberen Partikel!)

Die Aufschwemmung soll so dicht sein wie eine üppig gewachsene Bouillonkultur. Der Sicherheit halber ist es zweckmäßig, die Bakterien vor Anstellung der Reaktion durch Zusatz von 0,5 % Karbol ($^1/_{10}$ Volum 5 %iger Karbollösung) abzutöten.

b) Hochwertiges Immunserum. Meist leicht zu gewinnen durch eine mehrmalige Injektion von Kaninchen mit abgetöteten (durch eine Stunde lang auf 60 ° C erwärmten) Bakterienkulturen. Applikation intravenös oder intraperitoneal. Zwischenraum zwischen zwei Injektionen etwa 7 Tage. Blutentnahme 7—10 Tage nach der letzten Einspritzung.

Das Serum kann mit Zusatz von 0,5 % Karbolsäure im Dunkeln an kühlem Ort aufbewahrt werden; besser noch wird es im Vakuum getrocknet und zu 0,2 g in braune Röhrchen verteilt, die abgeschmolzen werden.

c) Kleine Reagenzröhrchen, etwa 10 cm lang, 0,9 cm innere Lichtung.

d) Meßpipetten, und zwar Hundertelgeteilte (Gesamtinhalt 1 ccm) für Herstellung der Serumverdünnung, Zehntelgeteilte (Gesamtinhalt 1 und 10 ccm) für Zusatz von Kochsalzlösung und Bakterienaufschwemmung. Die Einteilung muß bis zur Pipettenspitze reichen!

e) Physiologische Kochsalzlösung.

f) Eventuell: kleine gläserne Blockschälchen, wie sie zum Färben mikroskopischer Präparate benutzt werden.

g) Eventuell: Mikroskop mit Trockensystem von etwa 50facher Vergrößerung.

Ausführung.

Von dem Immunserum werden mit physiologischer Kochsalzlösung folgende Verdünnungen hergestellt:

1 : 50 (i. e. 0,1 ccm Serum + 4,9 ccm Kochsalzlösung)
1 : 100 (i. e. 4 „ d. Verd. 1 : 50 + 4 ccm Kochsalzlösung)
1 : 500 (i. e. 2 „ „ „ 1 : 100 + 8 „ „)
1 : 1000 (i. e. 1,0 „ „ „ 1 : 100 + 9 „ „)
1 : 2000 (i. e. 0,5 „ „ „ 1 : 100 + 9,5 „ „)

Von diesen kommt je 0,5 ccm in eines der erwähnten Reagenzröhrchen und dazu stets dieselbe Menge der homogenen Bakterienaufschwemmung, je nach deren Dichte 0,2—0,5 ccm, worauf der Inhalt sämtlicher Röhrchen durch Zusatz von Kochsalzlösung auf **1,0 ccm** ergänzt wird. Die Serumverdünnungen sind hierdurch natürlich verdoppelt worden.

Man kann übrigens auch direkt je eine Öse des Bakterienrasens in die verschiedenen Serumverdünnungen übertragen und daselbst möglichst fein verteilen.

Als Kontrollen dienen

a) die betreffende Bakterienmenge + Kochsalzlösung (Gesamtvolumen wie oben, 1 ccm);
b) die stärkste der verwendeten Serumverdünnungen + 24-stündige Kulturaufschwemmung jener Bakterienart, mit welcher der fragliche Stamm identifiziert werden soll und welche dem benutzten Immunserum homolog ist.

Sämtliche Proben kommen auf 1—3 Stunden in den Brutschrank (37 ° C) und werden dann mit freiem Auge oder bei schwacher Lupenvergrößerung betrachtet. Kontrolle a muß homogen geblieben sein, b, sowie die eigentlichen Versuchsproben müssen deutliche Häufchenbildung aufweisen, dann kann die Reaktion als positiv gelten.

Nach Pröscher kann man die verschiedenen, mit Serum und Kultur beschickten Reagenzröhrchen auch in kleine Blockschälchen ausgießen, die, übereinander gestellt, in den Brutschrank kommen und nach Ablauf der Zeit,

mit dem schwachen Trockensystem bei etwa 50facher Vergrößerung und gesenktem Kondensor betrachtet werden.

2. Im hängenden Tropfen angestellt.

Will man, um nicht Zeit zu verlieren, eine verdächtige, auf einer Platte gewachsene Kolonie direkt auf Agglutination prüfen, so muß man, wegen Mangel größerer Bakterienmengen, im hängenden Tropfen untersuchen.

Hierzu sind erforderlich:

a) Hohlgeschliffene Objektträger;
b) Deckgläser;
c) Vaseline, um den Rand der Höhlung der Objektträger zu bestreichen und den Luftabschluß der feuchten Kammer zu sichern (eventuell Pinsel zum Ausstreichen der Vaseline);
d) hochwertiges Immunserum siehe unter 1. b);
e) physiologische Kochsalzlösung;
f) Pipetten wie unter 1. d) beschrieben;
g) eine Platinöse und eine Platinnadel;
h) Mikroskop mit homogener Immersion.

Ausführung.

Man stellt sich von dem Immunserum, wie bei der Agglutinationsprobe im Reagenzglas, Verdünnungen her.

Etwa: 1 : 100 (d. i. 0,1 Serum + 9,9 Kochsalzlösung)
1 : 500 (d. i. 2 ccm Verd. 1 : 100 + 8 Kochsalzlösung)
1 : 1000 (d. i. 1 „ „ 1 : 100 + 9 „

Ist das Bakterienmaterial der zu prüfenden Kolonie sehr knapp, so muß man sich mit der einen Verdünnung 1 : 100 begnügen.

Von diesen Verdünnungen kommt mit Hilfe der Platinöse ein möglichst kleines Tröpfchen auf je ein gut gereinigtes Deckglas; mit der Platinnadel wird von der fraglichen Kolonie Material entnommen und sorgfältig in dem

Tröpfehen zu homogener Emulsion verrieben, so daß eben mit freiem Auge eine Trübung siehtbar wird. (Vorsicht wegen wegspritzender Tröpfehen!) Dann wird der mit Vaseline beschickte hohle Objektträger umgekehrt, d. i. mit der Höhlung nach unten sehend, auf das Deckglas aufgedrüekt, so daß der Tropfen genau in die Mitte zu liegen kommt und das Ganze umgedreht. Das Deckglas liegt dann oben, der Tropfen hängt in die Höhlung hinein. Sollte der letztere mit der unteren Wand der feuehten Kammer in Berührung getreten sein, so war der Tropfen zu groß und das Präparat ist unbrauchbar.

Bei sehr hochwirksamem Serum kann sofort naeh der Mischung mit den Bakterien, spätestens aber nach 20 Minuten dauerdem Aufenthalt im Brutsehrank Agglutination, d. i. Immobilisierung beweglicher Arten und Häufehenbildung beobaehtet werden; Häufchen, die nur am Rande des Tropfens liegen, während im Innern nur isolierte Bakterien zu sehen sind, haben keine Beweiskraft.

B. Prüfung des Serums eines Patienten auf Agglutination (Widalsehe Reaktion).

1. Im Reagenzglas angestellt.

a) Verfahren nach Pröscher):

Hierzu sind erforderlieh:

a) Serum des betreffenden Patienten, und zwar wenigstens 0,1 eem;

b) eine homogene Aufschwemmung der Bakterienart, welche als Krankheitserreger nachgewiesen werden soll (Typhusbazillen, Paratyphusbazillen, Dysenteriebazillen, Choleravibrio usw.). Für eine größere Anzahl von Untersuchungen kann man sich eine derartige Aufschwemmung im großen herstellen, etwa durch Beimpfung eines Liters Nährbouillon, und Abtötung der Bakterien naeh 24 bis 48stündigem Wachstum dureh Zusatz von 0,5% Karbol-

säure; auch Massenagarkulturen in flachen Flaschen angelegt und nach 24 Stunden in physiologischer, karbolisierter Kochsalzlösung aufgeschwemmt und durch Schütteln möglichst gleichmäßig verteilt, geben gute Emulsionen, die, im Kühlen aufbewahrt, monatelang zu verwenden sind. Da sich beim längeren Stehen die abgetätcten Bakterien allmählich sedimentieren, so ist die Emulsion vor jedem Gebrauch tüchtig durchzuschütteln. Stabiler sind übrigens die Emulsionen, wenn dieselben mit Kochsalzlösung bereitet werden, der außer Karbolsäure noch etwa 10 % Milchzucker zugesetzt wurde. Spontan agglutinierende Emulsionen sind unbrauchbar.

Für die Diagnose des Typhus und Paratyphus kann man sich übrigens auch mit Vorteil des (bei E. Merck in Darmstadt erhältlichen) Typhus- bzw. Paratyphusdiagnostikums von Ficker bedienen, welches die wirksamen Bestandteile der Bakterienleiber enthält und monatelang gebrauchsfähig bleibt. Beim Aufschütteln des sich allmählich absetzenden Niederschlags muß sich eine vollkommen homogene Emulsion ergeben.

Über Herstellung kleiner Emulsionsmengen vgl. A. 1. a).

c) Kleine Reagenzröhrchen, wie unter A. 1. c);
d) Meßpipetten wie unter A. 1. d);
e) physiologische Kochsalzlösung;
f) eventuell kleine gläserne Blockschälchen;
g) eventuell Mikroskop mit Trockensystem von etwa 50facher Vergrößerung.

Ausführung.

Man stellt sich zunächst eine Verdünnung des Patientenserums im Verhältnis von 1 : 10 her, indem man dasselbe mit Hilfe einer Pipette aufsaugt, abmißt und in ein kleines Reagenzgläschen ausbläst, worauf die neunfache Menge Kochsalzlösung hinzugefügt wird.

In eine Reihe kleiner in einem passenden Gestell stehender Reagenzgläser werden nun je 0,5 cem Koehsalzlösung eingefüllt, nur das erste Röhrehen der Reihe bleibt frei. Hierauf kommen dann in Röhrchen No. 1 und 2 je 0,5 cem der 10 faehen Serumverdünnung: in Röhrchen 3 kommen 0,5 cem, die aus 2 entnommen werden, in Röhrehen 4 entspreehend 0,5 cem aus Röhrehen 3 usf., wobei natürlich jedesmal gründliche Mischung der Flüssigkeiten und wiederholtes Durchblasen der zu allen diesen Prozeduren benutzten Pipette erforderlieh ist, wenn man nicht vorzieht, für jede Übertragung aus einem Röhrehen in das andere eine neue Pipette zu verwenden. So enthält sehließlich jedes Röhrehen 0,5 eem der Verdünnungen 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40 usw. Gewöhnlich legt man fünf bis seehs soleher Verdünnungen an.

Als Kontrollen dienen: ein Röhrehen ohne Serum, nur mit 0,5 ccm Koehsalzlösung.

Nun erfolgt der Zusatz der Bakterienaufsehwemmung, und zwar zu 0,3—0,5 ecm, worauf nötigenfalls das Gesamtvolumen des Röhrcheninhalts durch Zusatz von Koehsalzlösung auf 1 ecm ergänzt wird. Die Verdünnungszahlen haben sieh infolgedessen natürlieh verdoppelt. Folgendes Sehema erläutert die Herstellung dieser verschiedenen Verdünnungen:

Röhrchen No. .	1	2	3	4	5	6	7
Kochsalzlösung .	—	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Serumverd. 1 : 10	0,5	**0,5**	—	—	—	—	—
aus Röhrchen 2	—	—	**0,5**	—	—	—	—
„ „ 3	—	—	—	**0,5**	—	—	—
„ „ 4	—	—	—	—	**0,5**	—	—
„ „ 5	—	—	—	—	—	**0,5**	—
„ „ 6	—	—	—	—	—	0,5 fortgegossen	—
Resultierende Verdünnung nach Zusatz von 0,5 Bazillenaufschwemmung	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320	1 : 640	Kontrolle

Im weiteren wird verfahren, wie bei Ausführung von A. 1. beschrieben.

Bei Benutzung des Fickerschen Diagnostikums bleiben die Röhrchen bei Zimmertemperatur stehen und sollen nach 10—14, höchstens nach 20 Stunden Klärung bzw. Niederschlagsbildung aufweisen.

Als positiv gilt die Reaktion bei Typhus erfahrungsgemäß, wenn noch in der Verdünnung von 1:40—80 Agglutination eingetreten ist. In zweifelhaften Fällen ist die Reaktion nach 2—3 Tagen zu wiederholen, da dann häufig der Agglutiningehalt des Serums zugenommen hat, wenn es sich um Typhus handelt. Bei Ikterus wurde, auch ohne daß Typhus bestand, Agglutination bis 1:75 beobachtet und sollen erst Werte von 1:100 beweisend sein.

Da es für die klinische Typhusdiagnose meist von großer Bedeutung ist, festzustellen, ob überhaupt eine durch Typhus-ähnliche Bazillen hervorgerufene Erkrankung vorliegt, so empfiehlt es sich, die Agglutinationsreaktion nicht nur mit dem echten Typhusbazillus, sondern gleichzeitig auch mit dem Bacillus paratyphi A u. B (bzw. mit dem entsprechenden Paratyphusdiagnostikum Fickers) anzustellen.

b) Verfahren nach Kafka[1]):

Hierzu sind erforderlich, abgesehen von dem Patientenserum:

1. Kleine Standgläschen für Mengen von 3—5 ccm Flüssigkeit.
2. Eine Kapillarpipette, die aus einer beliebigen, etwa 5 mm Durchmesser haltenden Glasröhre hergestellt und empirisch derart geeicht wird, daß sie in $^1/_2$ ccm bei senkrechter Haltung genau 40 Tropfen faßt.
3. Fickers Typhus- und Paratyphusdiagnostika.
4. Eine in $^1/_{10}$ ccm geteilte, im ganzen 5 ccm fassende Meßpipette.

1) Kafka, Zentralbl. f. Bakt. 1906, Bd. XL.

Ausführung.

In die Standgläschen werden von jedem „Diagnostikum“ 0,5, 1,0 und 2,5 ccm eingefüllt. Dann wird überall mit Hilfe der Kapillarpipette je 1 Tropfen Serum hinzugefügt, wodurch die Verdünnungen von 1:40, 1:80 und 1:200 entstehen, durch dreimaliges Umkippen der Gläschen gründlich durchgemischt, und dann bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 24 Stunden werden die Gläschen betrachtet. Als Mindestmaß für die Diagnose eines bestehenden (nicht etwa schon vor längerer Zeit abgelaufenen) Abdominaltyphus wird gefordert, daß noch in der Verdünnung 1:200 beim Typhusdiagnostikum Agglutination eingetreten sei, während die Paratyphusdiagnostika niederen Titer ergeben. Zeigen dagegen zwei oder alle drei angesetzten Diagnostika in den höchsten Verdünnungen von 1:200 positive Reaktionen, so muß das Serum entsprechend verdünnt werden und die Titrierung neuerdings vorgenommen werden, bis in einem Diagnostikum ein höherer Titerwert gefunden wird als in den beiden anderen. Als Schema für die hierbei anzulegenden Verdünnungen kann folgende Tabelle dienen.

4	Tropfen	Serum	10fach	verd.	+ 0,5	ccm	Diagnostikum	= 1 :	100
2	„	„	„	„	+ 0,5	„	„	= 1 :	200
1	„	„	„	„	+ 0,5	„	„	= 1 :	400
1	„	„	„	„	+ 1,0	„	„	= 1 :	800
1	„	„	„	„	+ 1,5	„	„	= 1 :	1200
1	„	„	„	„	+ 2,0	„	„	= 1 :	1600
1	„	„	„	„	+ 2,5	„	„	= 1 :	2000

u. s. f.

Diejenige Bakterienart, welche dem am stärksten agglutinierten Diagnostikum entspricht, ist mit gewissem Vorbehalt als der Krankheitserreger anzusehen. Ist der gefundene Titerwert für Typhus und für Paratyphus Schottmüller gleich hoch, oder übertrifft der Titer für Paratyphus den für Typhus nur um ein geringes, so handelt es sich gleichwohl um Typhus[1]).

1) Güttler, Berl. klin. Wochenschr. 1904, No. 51/52.

2. Im hängenden Tropfen angestellt.

Hierzu sind erforderlich

a) das zu untersuchende Serum;
b) Deckgläser;
c) Vaseline (eventuell Pinsel);
d) hohlgeschliffene Objektträger;
e) physiologische Kochsalzlösung;
f) Pipetten in Hundertstel geteilt (Gesamtinhalt 0,1 ccm) und in Zehntel geteilt (Inhalt 10 ccm und 1,0 ccm) wie bei A 1. d);
g) Mikroskop mit homogener Immersion;
h) eine 10—24 Stunden alte Agarkultur der Bakterienart, gegen welche die Agglutination geprüft werden soll (Typhus, Paratyphus usw.);
i) eine Platinnadel und Platinöse.

Ausführung.

Wie bei A 2, nur mit folgendem Unterschied:

Von dem Patientenserum stellt man folgende Verdünnungen her:

1: 25 (d. i. 0,1 ccm Serum + 2,4 Kochsalzlösung)
1: 50 (d. i. 1 ccm Verd. 1:25 + 1 ccm Kochsalzlösung)
1:100 (d. i. 0,5 „ „ 1:50 + 0,5 „ „)
1:150 (d. i. 0,5 „ „ 1:50 + 1 „ „)

In je einem Tröpfchen dieser Flüssigkeiten wird dann eine Spur der betreffenden Bakterienkultur mit der Spitze der Platinnadel verrieben.

Als Kontrolle diene 1. ein Tröpfchen Bouillon oder Kochsalzlösung + Bazillen;

2. ein Tröpfchen verdünnten, hochwirksamen Immunserums + Bazillen.

Soll die Reaktion als positiv angesehen werden, so muß in den Verdünnungen 1:25, 1:50 und 1:100, sowie in Kontrolle 2 Agglutination eingetreten sein, dagegen Kontrolle 1 unverändert geblieben sein.

C. Diagnose von Mischinfektionen mit Hilfe der Agglutinationsprobe.

Absättigungsversueh von CASTELLANI[1]).

Prüft man die Wirksamkeit des Serums eines Infektionskranken sowohl gegenüber dem Krankheitserreger selbst als aueh gegenüber verwandten Bakterienarten (also z. B. bei echtem Typhus gegen Paratyphus), so findet man häufig aueh diesen letzteren gegenüber ein erhöhtes Agglutinationsvermögen, obwohl diese Mikroorganismen gar nicht an dem Krankheitsprozeß beteiligt sind (Mitagglutination).

Andrerseits ist aber natürlieh aueh bei Misehinfektion (z. B. mit Typhus und Paratyphus B) die Agglutinationskraft des Serums beiden Arten gegenüber gesteigert. Um nun im gegebenen Falle, wenn das Serum eines Patienten mehrere Bakterienarten gleiehzeitig agglutiniert, zu entscheiden, ob es sich nur um Mitagglutination handelt, oder um Misehinfektion, stellt man den CASTELLANIsehen Versuch an.

Prinzip: a) das Serum eines gegen einen einzigen Mikroorganismus immunisierten Individuums verliert seine Wirksamkeit allen Arten gegenüber, die es beeinflußte, wenn es mit dem betreffenden homologen Stamm in Berührung gebracht wird (Absorption des Agglutinins dureh die homologe Bakterienart). Wird das Serum dagegen mit jenen Bakterienarten zusammengebraeht, die nur dureh Mitagglutionation beeinflußt wurden, so verliert es sein Agglutinationsvermögen nur für diese, nicht für den homologen Stamm;

b) das Serum eines gegen zwei versehiedene Mikroorganismen A und B immunisierten Individuums verliert naeh Versetzung mit A nur seine Agglutinationskraft für A, naeh Versetzung mit B nur sein Agglutinationsvermögen für B.

1) CASTELLANI, Zeitschr. f. Hyg. 1902, Bd. XL.

Erforderlich sind dieselben Gerätschaften wie zur Anstellung der Widalschen Reaktion überhaupt, die dem Castellanischen Versuch ja voranzugehen hat.

Ausführung.

Je 0,5—1 ccm des zu untersuchenden Serums, das, wie wir e. c. annehmen wollen, gleichzeitig Typhusbazillen und Bacterium coli agglutiniert, werden in enge Reagenzröhrchen gebracht und nun mit relativ großen Mengen (4—8 großen Ösen einer 24 stündigen Agarkultur) a) von B. typhi, b) von B. coli versetzt. Die Bakterienmasse wird möglichst fein verteilt und die Emulsion dann auf 12 Stunden in den Thermostaten gebracht. Nach Ablauf dieser Zeit prüft man, ob die Sera, die durch Zentrifugieren von dem agglutinierten Bakterienmateriale getrennt wurden, noch gegen Typhus- bzw. Colibazillen wirksam sind, in welchem Falle der Bakterienzusatz wiederholt werden müßte. Ist der Agglutiningehalt der Sera dagegen erschöpft — die Emulsion bleibt dann trübe — so wird durch scharfes Zentrifugieren (oder durch 12—24 stündige Sedimentierung im Eisschrank) die Hauptmasse der Bakterien entfernt und nun ein Agglutinationsversuch gegenüber jener Bakterienart, die nicht zur Absorption benutzt worden war, angestellt (also bei Probe a) gegenüber Coli, bei Probe b) gegenüber Typhus).

Ergibt dieser Versuch, daß die Wirksamkeit gegenüber Baeterium coli trotz der Absorption mit Typhusbazillen und die Wirksamkeit gegenüber B. typhi trotz Absorption mit B. coli fast unverändert geblieben ist, so handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine Mischinfektion von Coli und Typhus. Ist dagegen die agglutinierende Kraft des Serums gegenüber Baeterium coli infolge der Absorption mit Typhusbazillen erloschen, so liegt höchstwahrschcinlich nur Infektion mit Bacterium typhi vor und die Wirkung auf Bacterium coli ist nur als Mitagglutination aufzufassen.

Die praktischen Erfahrungen mit der Castellanischen Methode sind noch keine sehr umfangreichen.

IV. Bakterizide Reaktionen.

A. Im Tierversuch: Pfeiffersche Reaktion.

Prinzip: Wird eine Bakterienkultur mit homologem Immunserum gemischt in die Bauchhöhle eines Meerschweinchens eingespritzt, so tritt binnen kurzer Zeit Auflösung der Bakterien unter typischer Granulabildung ein, während dieselben bei Verwendung normalen Serums oder heterologen Immunserums intakt und eventuell lebhaft beweglich bleiben.

Anwendungen.

1. Agnoszierung einer fraglichen, aus Dejekten, Wasser usw. isolierten Bakterienart.

(Meist handelt es sich um Cholera- oder ähnliche Vibrionen, Typhus- eventuell Paratyphusbazillen.)

Hierzu sind erforderlich:

a) Vier Meerschweinchen von etwa 200—300 g Körpergewicht;

b) hochwertiges Immunserum. Meist leicht zu gewinnen durch ein- oder mehrmalige Einspritzung des bei 60° abgetöteten Rasens von schrägen Agarkulturen derjenigen Bakterienart, mit welcher der fragliche Stamm identifiziert werden soll, in die Bauchhöhle von Kaninchen. Die Tiere werden 14 Tage nach der letzten Injektion getötet.

Das Serumgemisch mehrerer so behandelten Tiere wird zur Konservierung im Vakuum getrocknet und in kleinen braunen Glasphiolen zu je 0,2 aufbewahrt. Dasselbe wird vom königl. preuß. Institut für Infektionskrankheiten in Berlin an amtliche bakteriologische Institute abgegeben.

Das Serum muß so wirksam sein, daß mindestens 0,0002 g davon genügen, um eine Öse (= 2 mg) einer

18stündigen virulenten Cholera- bzw. Typhuskultur, die mit 1 ccm Bouillon in die Bauchhöhle von Meerschweinchen eingespritzt wird, innerhalb einer Stunde vollkommen in Granula zu verwandeln. Sein „Titer" muß also mindestens 0,0002 g betragen;

c) normales Kaninchenserum, eventuell in der gleichen Weise getrocknet;

d) eine 18stündige Kultur der fraglichen zu prüfenden Bakterienart auf schrägem Agar;

e) eine Spritze mit stumpfer Hohlnadel;

f) Schere und Pinzette zur Durchtrennung der äußeren Haut bei der Injektion;

g) mehrere Kapillaren, die man sich durch Ausziehen von etwa 0,5 cm weiten Glasröhrchen in der Bunsenflamme herstellt, zur Entnahme von Peritonealinhalt. Dieselben sind an dem weiteren Ende mit etwas Watte zu verschließen, um beim Ansaugen eine Infektion zu vermeiden;

h) vier Spitzgläser (von der Größe und Form von Likörgläsern) zur Mischung der Injektionsflüssigkeiten;

i) hohle Objektträger, Deckgläser, Vaseline, zur Anfertigung hängender Tropfen;

k) eine kalibrierte Platinöse (zu 2 mg) für die Entnahme des Bakterienmaterials;

l) Pipetten, in Hundertstel Kubikzentimeter geteilt (Inhalt 0,1 ccm) und in Zehntel Kubikzentimeter geteilt (Inhalt 10 ccm und 1,0 ccm);

m) sterile Nährbouillon;

n) physiologische Kochsalzlösung.

Ausführung.

In drei Spitzgläser kommen: je 1 ccm Nährbouillon (nicht Kochsalz- oder Peptonlösung) und je eine Öse der zu untersuchenden Agarkultur, die durch Verreiben mit der Platinöse an der Wand des Gläschens verteilt wird.

In Gläschen 1 kommt ferner die fünffache Titerdose des Serums (also etwa 1 mg von einem Serum mit dem Titer 0,002).

In Gläschen 2 kommt die 10 fache Titerdose (also in unserem Beispiel 2 mg).

In Gläschen 3 kommt als Kontrolle die 50 fache Titerdose vom normalen Serum derselben Tierart, von der das Immunserum stammt.

Diese verschiedenen Serumdosen müssen, um stets gleiche Verhältnisse zu haben, stets im gleichen Flüssigkeitsvolum zugesetzt werden, weshalb man passende Verdünnungen herstellen muß. In unserem Beispiel würde man etwa 0,2 g Trockenserum in 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung lösen. — Von dieser Verdünnung würden 0,2 ccm also 0,002 g = 2 mg enthalten und zu Gläschen 2 hinzugesetzt werden.

Verdünnt man einen Teil dieser Stammlösung aufs Doppelte, so wäre nun in 0,2 ccm 1 mg Serum enthalten, welche Dosis für Gläschen 1 bestimmt ist. Von dem Normalserum dagegen wären 0,2 ccm einer Lösung von 0,2 g Trockensubstanz in 4 ccm Kochsalzlösung zu verwenden.

In Gläschen 4 endlich kommt neben 4 ccm Bouillon und 0,8 ccm Kochsalzlösung 1 Öse der Agarkultur, so daß in der Injektionsdose von 1,2 ccm gerade $^1/_4$ Öse enthalten ist.

Der Inhalt der verschiedenen Gläschen wird gründlich gemischt, worauf die Einspritzung erfolgt. Nach Durchschneidung der äußeren Haut durch einen kurzen Scherenschlag wird die Bauchdecke mit der stumpfen Kanüle durchstoßen und jedem der vier Meerschweinchen der Inhalt eines Gläschens (bzw. von No. 4 1,2 ccm) injiziert.

Nach 20 Minuten und einer Stunde wird dann an derselben Stelle mit Hilfe der Kapillarröhrchen ein Tröpfchen Peritonealflüssigkeit entnommen (meist genügt der intra-

abdominelle Druck, um sie in der Kapillare aufsteigen zu lassen) und dann im hängenden Tropfen untersucht.

Wenn bei Meerschweinchen 1 und 2 spätestens nach einer Stunde Granulabildung auftritt, bei 3 und 4 dagegen große Mengen lebhaft beweglicher und gut erhaltener Vibrionen vorhanden sind, ist die Reaktion als positiv anzusehen und die Diagnose gesichert.

2. Nachweis der bakteriziden Antikörper im Serum von Kranken oder Rekonvaleszenten (zur Feststellung abgelaufener Cholerafälle usw.).

Hierzu sind erforderlich: dieselben Requisiten wie bei 1. nur mit folgendem Unterschied:

An Stelle von d) hat eine 18stündige Kultur echter Choleravibrionen (bzw. Typhusbazillen) auf schrägem Agar zu treten. An Stelle von b) das zu untersuchende Serum des Patienten.

Ausführung.

Es werden Verdünnungen des Patientenserums mit 20, 100 und 500 Teilen Bouillon hergestellt und je 1 ccm dieser Verdünnungen in die drei Spitzgläschen gebracht, welche dann mit 1 Öse Kultur beschickt werden.

Gläschen 4 erhält 4 ccm Bouillon ohne Serum + 1 Öse Kultur, wobei die Injektionsdose hier (1 ccm entsprechend) $^1/_1$ Öse beträgt. Im übrigen siehe A 1.

Bei Granulabildung im Peritoneum von Meerschweinchen 1—3 und Fehlen des Bakterienzerfalls bei 4 ist die Reaktion als positiv anzusehen und somit die Diagnose auf Cholera usw. zu stellen.

Sollte bei Ausführung der Reaktion auch Meerschweinchen 4 Granulabildung aufweisen, so ist der betreffende Bakterienstamm als ungeeignet anzusehen.

B. Bakterizider Reagenzglasversuch.

Nachweis bakterizider Substanzen im Blutserum von Kranken.

Von Stern und Korte[1]) für Typhus ausgearbeitet; kompliziert, und nur ausnahmsweise für Fälle zu empfehlen, wo die Agglutination unsichere Resultate geliefert hat.

Prinzip: zu einer an und für sich unwirksamen Mischung von frischem, komplementhaltigen Normalserum werden verschiedene Mengen des zu prüfenden inaktivierten, d. i. auf 56° erhitzten Serums des Patienten hinzugefügt und bestimmt, bis zu welcher Serumverdünnung durch Plattenaussaat noch bakterizide Wirkung nachweisbar ist, d. h. Keimverminderung gegenüber den Kontrollproben besteht.

Hierzu sind erforderlich:

a) das Serum des Patienten, durch eine halbe Stunde auf 56° erhitzt, dann mit steriler 0,85%iger Kochsalzlösung auf das 50—100fache verdünnt;
b) frisches, am Tage des Versuches gewonnenes Serum eines normalen Kaninchens, 10—15fach verdünnt, als Komplementquelle;
c) eine 24stündige Typhusbouillonkultur, 500fach verdünnt mit steriler physiologischer Kochsalzlösung;
d) sterile, mit Wattepfrof versehene kurze (etwa 10 cm lange) Röhrchen von der Weite gewöhnlicher Reagenzgläser, in einem Reagenzglasgestell;
e) sterile physiologische Kochsalzlösung;
f) sterile Petrischalen;
g) sterile Röhrchen mit Nähragar;
h) sterile, in Zehntel Kubikzentimeter geteilte Pipetten (Inhalt 10 ccm und 1,0 ccm);
i) ein Wasserbad zum Verflüssigen des Nahragars;
k) ein Thermometer;

1) Berl. klin. Wochenschr. 1904.

l) ein auf 37° C eingestellter Brutschrank (unter Umständen entbehrlich).

Ausführung.

In 12 nebeneinander im Reagenzglasgestell stehende Röhrchen kommt je 1,0 ccm steriler Kochsalzlösung. In das erste Röhrchen dieser Reihe wird dann 1,0 ccm des inaktivierten und verdünnten zu prüfenden Patientenserums gebracht, durch wiederholtes Aufsaugen und Wiederausfließenlassen gut durchgemischt, von dem Gemisch (mit derselben Pipette) 1 ccm angesaugt und in das nächstfolgende Röhrchen übertragen. Hier wird wieder gut durchgemischt, 1 ccm abgesaugt und in das dritte Röhrchen gebracht usf., bis man bei dem 12. Gläschen angelangt ist. Der aus diesem nach der Vermischung entnommene 1 ccm wird fortgegossen.

Sämtliche Röhrchen enthalten nunmehr 1 ccm Flüssigkeit und zwar in den Verdünnungen $^1/_2$, $^1/_4$, $^1/_8$ usw. der Anfangsverdünnung des Patientenserums.

Zu allen diesen Proben kommen nun noch 0,5 ccm der Bakterienemulsion und zuletzt 0,5 ccm des verdünnten Komplementserums.

Als Kontrollproben dienen:

1. a) und b): je 1,5 ccm Kochsalzlösung + 0,5 ccm Bazillenemulsion.

2. 1,0 Kochsalzlösung + 0,5 ccm Komplementserumverdünnung + 0,5 Bazillenemulsion.

Röhrchen 1 a) wird sofort mit verflüssigtem, auf 41° C abgekühltem Agar beschickt und nach vorsichtiger aber rascher Mischung der ganze Inhalt in eine Petrischale ausgegossen. Diese Platte zeigt die Größe der ursprünglichen Bakterienaussaat an.

Sämtliche übrigen Röhrchen kommen auf drei bis vier Stunden in den Brutschrank, und werden erst nach Ablauf dieser Zeit in gleicher Weise wie 1 a zu Platten verarbeitet.

(Eventuell können übrigens statt Agarplatten auch Gelatineplatten angelegt werden.)

Kontrolle 1 b gibt dann an, wie stark sich die Bakterien während dieser Zeit ohne Einwirkung bakterizider Substanzen vermehrt hätten; Kontrolle 2 zeigt die Unwirksamkeit des Komplementserums für sich allein, ohne die spezifischen Bakteriolysine des Patientenserums. Findet sich bei dieser Kontrollprobe wider Erwarten starke bakterizide Wirkung, so ist die ganze Versuchsreihe unbrauchbar.

Die Besichtigung der Platten, die, den Schalendeckel nach unten, in den Brutschrank gestellt werden, kann schon nach 12 Stunden erfolgen. (Gelatineplatten, die bei 22° C aufrecht aufbewahrt werden sollen, sind erst nach 48 Stunden zur Betrachtung reif.)

Eine Auszählung der angegangenen Kolonien ist überflüssig, da nur auf große, ohne weiteres erkennbare Unterschiede Gewicht zu legen ist.

Zur Veranschaulichung sei ein Versuch von Stern und Korte mit einem sehr hochwertigen Typhusserum hier wiedergegeben: (siehe Tabelle S. 53.)

Sera nicht typhöser Individuen zeigten nach Hahn[1]) nur in etwa einem Drittel der Fälle überhaupt einen bakteriziden Effekt, der zudem nur ganz ausnahmsweise über die Verdünnung $^1/_{500}$ hinaus nachweisbar war. Dagegen waren die Sera fiebernder oder kürzlich entfieberter typhöser Patienten sämtlich in mehr als 1000facher, meist sogar noch in 50 000facher Verdünnung wirksam. (In unserem S. 53 angeführten Beispiel reicht die Wirkung eben bis $^1/_{2\,048\,000}$, ist aber bei $^1/_{512\,000}$ noch sehr intensiv.)

Je höher der bakterizide Titer eines zu untersuchenden Serums über die gewöhnlich bei normalen Serum gefundenen Werte hinausgeht, desto wahrscheinlicher ist es, daß es sich um eine Infektion mit Typhusbazillen handelt.

1) Hahn, Deutsches Arch. f. klin. Medizin 1905.

		Nach 3h bei 37° Platten gegossen
1 ccm Typh.-Ser. $\frac{1}{2000}$ + 0,5 Typh.-Kultur + 0,5 Kan.-Ser. $\frac{1}{12}$		
1 „ „ $\frac{1}{4000}$ + 0,5 „ + 0,5 „		0—100 Kolonien
1 „ „ $\frac{1}{8000}$ + 0,5 „ + 0,5 „		
1 „ „ $\frac{1}{16000}$ + 0,5 „ + 0,5 „		
1 „ „ $\frac{1}{32000}$ + 0,5 „ + 0,5 „		
1 „ „ $\frac{1}{64000}$ + 0,5 „ + 0,5 „		
1 „ „ $\frac{1}{128000}$ + 0,5 „ + 0,5 „		100—1000 Kolonien
1 „ „ $\frac{1}{256000}$ + 0,5 „ + 0,5 „		
1 „ „ $\frac{1}{512000}$ + 0,5 „ + 0,5 „		Mehrere 1000 Kolonien
1 „ „ $\frac{1}{1024000}$ + 0,5 „ + 0,5 „		Weniger als bei Kontrolle 2
1 „ „ $\frac{1}{2048000}$ + 0,5 „ + 0,5 „		Weniger als bei Kontrolle 2
1 „ „ $\frac{1}{4096000}$ + 0,5 „ + 0,5 „		Wie bei Kontrolle 2
Kontrollen:		
1. a) 1,5 ccm NaCl + 0,5 Typh.-Kultur, sofort gegossen		35 000 Kolonien
b) 1,5 „ „ + 0,5 „ nach 3 Stunden		∞ „
2. 1 „ „ + 0,5 „ + 0,5 Kan.-Ser. $\frac{1}{12}$ nach 3 Stunden		∞ „

V. Hämolytische Reaktionen.

„Klinische Alexinprobe" nach Moro[1]).

Prinzip: Zu einem Gemisch von gewaschenen Erythrozyten mit einer zur Lösung hinreichenden Menge hämolytischen aber inaktivierten Immunserums (Ambozeptorserum) wird menschliches Serum in einer bestimmten Quantität hinzugesetzt und nach 2stündigem Aufenthalt der Proben im Brutschrank der hämolytische Effekt bestimmt. Sein Grad gibt einen ungefähren Maßstab über den Komplement- (Alexin)gehalt des betreffenden Serums an.

Hierzu sind erforderlich:

1. Eine 10% Aufschwemmung gewaschener Hammelerythrozyten in physiologischer Kochsalzlösung.
2. Hochwertiges Hammelblutimmunserum, als Ambozeptorquelle, inaktiviert.
3. Das zu prüfende aktive Menschenserum. Zur Gewinnung desselben genügen etwa 5, dem angestochenen Ohrläppchen entnommenen Blutstropfen.
4. Pipetten in 0,1—0,05 ccm geteilt.
5. Reagenzröhrchen von 5—6 mm innerer Lichte und ca. 5 cm Höhe; Reagenzglasgestelle.
6. Eventuell: ein Sahlisches Hämometer.

Ausführung.

Das hämolytische System besteht aus folgenden Komponenten:

0,1 ccm Hammelblutaufschwemmung + 0,1 ccm einer 2‰ Lösung i. a. Immunserums (vom Titer $^1/_{1000}$—$^1/_{1500}$) + 0,025 ccm (0,1 ccm 4fach verdünnten) frischen Menschenserums.

Dabei erfolgt entweder komplette Hämolyse, oder es bleibt ein ungelöster Erythrozytenrest zurück.

1) Münch. med. Wochenschr. 1907, No. 21. u. 31. Außerdem briefliche Mitteilung.

Zur Bestimmung des Blutkörperchenrestes zentrifugiert man, gießt die obenstehende Flüssigkeit vom Bodensatz, der aus Erythrozyten besteht, ab und löst die Blutkörperchen in 0,1 $^{n}/_{10}$ Salzsäure. Die gelbe bis braune Verfärbung der entstandenen Lösung rührt von der Überführung des Hämoglobins in salzsaures Hämatin her. Die Flüssigkeit wird quantitativ in das dem Instrumentarium des Sahli-schen Hämometers beigegebene produzierte Gläschen übertragen und der Farbenton der Hämatinlösung mit jenem der Standardlösung (nach Sahli) verglichen.

Dabei kann:

1. Der Farbenton der Lösung lichter als jener der Vergleichslösung sein; man notiert dieses Ergebnis in der Form: $n < 0{,}1$, wobei n die Flüssigkeitsmenge darstellt, in welcher der Blutkörperchenbodensatz gelöst werden muß, um gleiche Farbennuance zu geben wie die Standardlösung;
2. er kann ihm gleich sein: $n = 0{,}1$;
3. er kann dunkler sein als der Ton der Standardlösung. In diesem Falle verdünnt man die Hämatinlösung bis zur Farbengleichheit der Standardlösung. Wird dies z. B. durch Zusatz von 0,25 ccm Wasser erzielt, so notiert man $n = 0{,}1 + 0{,}25$ oder kurz 0,35.

Nach diesem Verfahren ergibt sich für die ganze verwendete Erythrozytenmasse der Wert: 0,8 (s. ungelöste Kontrolle).

A. Bei vollständigem Mangel an Komplementwirkung resultiert dementsprechend der Wert: 0,8.
B. Werte zwischen 0,75—0,4 sprechen für einen mehr oder weniger beträchtlich verminderten Komplementgehalt.
C. Normaler Komplementgehalt entspricht den Werten: 0,4—0,1.
D. Die Werte: 0,1—0,0 zeigen einen übernormal gesteigerten Komplementgehalt an.

Zur Ausschaltung der natürlichen Ambozeptorwirkung des menschlichen Aktivserums, die den Ablauf der Hämolyse gelegentlich störend zu beeinflussen vermag, erwies sich folgendes System als das geeignetere:

0,1 ccm 10 % Menschenerythrozytenemulsion + 0,1 ccm entsprechend verdünntes Menschenblutimmunserum vom Kaninchen (das die eben lösende Dosis für 0,1 Menschenblutaufschwemmung enthält), + 0,025 ccm frisches Menschenserum.

Im Übrigen gestaltet sich das weitere Verfahren prinzipiell gleich, wie oben.

VI. Antihämolytische Reaktionen.

(Verfahren der Komplementablenkung.)

Prinzip: Wenn eiweißartige Antigene in Gegenwart von aktivem (= komplementhaltigem) Normalserum mit ihren homologen, spezifischen Antikörpern in Berührung treten, so findet eine Bindung des Komplements statt. Dieselbe äußert sich darin, daß das Gemisch trotz seines Komplementgehalts nun nicht mehr befähigt ist, ein hämolytisches System (sensibilisierte rote Blutkörperchen, die mit hämolytischen Ambozeptoren beladen sind) zur Auflösung zu bringen. Diese Komplementablenkung, die spezifisch ist, ermöglicht also den Nachweis gewisser Antigene (z. T. bakteriellen Ursprungs) bzw. der ihnen entsprechenden Antikörper in dem zu untersuchenden Materiale und stellt in mancher Hinsicht eine Konkurrenzmethode der Präzipitinreaktionen dar.

Anwendungen.

A. Nachweis eiweißartiger Antigene

(z. B. von Menscheneiweiß in Blutflecken; oder von bakteriellen Substanzen im Serum von Kranken).

Teehnik naeh Rickmann[1]).

Hierzu sind erforderlich:

a) ein hoehwirksames Immunserum gegen jene Antigene, welehe in dem zu untersuehenden Materiale naehgewiesen werden sollen, von bekanntem Titer (Herstellung siehe S. 20: Präzipitinreaktionen Aa);

b) frisehes, am selben Tage gewonnenes, komplementhaltiges Serum normaler Meersehweinehen (Komplementserum);

e) eine 5%ige Aufsehwemmung mehrfaeh mit physiologiseher Koehsalzlösung gewasehener (vom Serum befreiter) Rinder (oder Hammel-)blutkörperehen; (man stellt sieh die 5%ige Aufsehwemmung des defibrinierten Blutes in physiologiseher Koehsalzlösung her, zentrifugiert, gießt die klare Flüssigkeit ab und ersetzt dieselbe dureh die gleiche Menge neuer Kochsalzlösung. Diese Prozedur wird mindestens dreimal wiederholt);

d) eine vollkommen klare Lösung der zu untersuehenden Substanz (Blutspuren sind in gleicher Weise in Lösung zu bringen wie für die Präzipitinreaktion);

e) eine Lösung jenes Antigens, dessen Naehweis in dem zu untersuehenden Materiale erbraeht werden soll. (Also z. B. Mensehenserum; oder, wenn es sieh um das Serum eines Typhuskranken handelt, ein Typhusbazillenextrakt.)

Lüdke[2]) hat ein solehes Typhusbazillenextrakt in folgender Weise hergestellt: eine Aufsehwemmung einer 24-stündigen Agarkultur in Wasser wurde durch $^1/_2$stündiges Erwärmen auf 60° abgetötet, zentrifugiert, der aus Bazillen bestehende Bodensatz getroeknet und die Bazillenmasse dann im Aehatmörser unter tropfenweisem Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung sorgfältig zerrieben. Durch weiteres

1) Rickmann, Arbeiten aus dem Königl. Institut für experim. Therapie in Frankfurt 1907.

2) Lüdke, Zur Kenntnis der Komplemente, Würzburg 1908.

Auffüllen mit Kochsalzlösung wurde so eine leichte opaleszierende Flüssigkeit erhalten.

Leuchs[1]) gibt folgende Vorschrift: Kollesche Schalen, deren beimpfte Fläche etwa der von 10 Agarröhrchen entspricht, werden mit der betreffenden Bakterienart infiziert, der Bakterienrasen nach 24stündiger Bebrütung bei 37° mit je 5 ccm sterilem, destilliertem Wasser abgeschwemmt, die Aufschwemmung dann zur Abtötung der Bakterien 24 Stunden bei 60° gehalten und dann weitere 24 Stunden im Schüttelapparat bei Zimmertemperatur der Autolyse überlassen. Hierauf wird die Aufschwemmung energisch zentrifugiert und die klare überstehende Flüssigkeit mit 0,5% Phenol versetzt im Eisschrank konserviert, wo sie sich mindestens 6—8 Wochen unverändert brauchbar erhält;

f) inaktives (eine halbe Stunde auf 56° erhitztes) von Kaninchen gewonnenes hochwirksames Immunserum gegen Rinderblut (Hammelblut) (Ambozeptorserum). Dasselbe muß wie alle hier verwendeten Flüssigkeiten vollkommen klar sein;

g) kleine Reagenzröhrchen von 0,9—1 cm Weite und 10 cm Länge;

h) Meßpipetten, in Hundertstel Kubikzentimeter geteilt (Inhalt 0,1 ccm) und in Zehntel Kubikzentimeter geteilt (Inhalt 1 ccm und 10 ccm);

i) physiologische Kochsalzlösung;

j) ein auf 37° eingestellter Thermostat;

k) ein Wasserbad, zur Inaktivierung der Sera.

Ausführung.

Der Ausführung der eigentlichen Untersuchung muß eine Wertbestimmung (Titerbestimmung) des Ambozeptorserums des Komplementserums sowie des Eiweißimmunserums vorangehen.

1) Leuchs, Berl. klin. Wochenschr. 1907.

1. Einstellung des Ambozeptorserums.

In eine Reihe von Reagenzröhrchen kommt je 1 ccm der Rinderblutaufschwemmung, je 0,1 ccm Komplementserum und absteigende Mengen des inaktiven Ambozeptorserums, etwa in folgender Weise:

100fache Verd. des Ambozeptorserums mit Kochsalzlösung	0,25 ccm	= 0,0025	Orig.-Ser.
do.	0,15 „	= 0,0015	„
do.	0,10 „	= 0,001	„
1000fache Verd. des Ambozeptorserums mit Kochsalzlösung	0,75 „	= 0,00075	„
do.	0,50 „	= 0,0005	„
do.	0,35 „	= 0,00035	„
do.	0,25 „	= 0,00025	„
do.	0,15 „	= 0,00015	„
do.	0,10 „	= 0,00010	„

Als Kontrolle eine Probe ohne Ambozeptorserum. Der Inhalt aller Röhrchen wird durch Zusatz von Kochsalzlösung auf gleiches Volum (2,1—2,5 ccm) gebracht und dann, nach gründlichem Durchmischen, die Röhrchen zwei Stunden bei 37° C gehalten. Nach Ablauf dieser Zeit wird notiert, bei welcher Ambozeptordose eben noch vollkommene Hämolyse aufgetreten ist. Zu den weiteren Versuchen wird dann das $1^1/_2$—2fache Multiplum dieser Dose benutzt, die in 0,1—0,2 ccm Flüssigkeit enthalten sein soll, wonach die zu verwendende Verdünnung des Ambozeptorserums zu bemessen ist.

2. Einstellung des Komplementserums.

Eine Reihe von Reagenzgläschen wird nun mit der festgestellten Ambozeptordosis, mit je 1 ccm Blutaufschwemmung und mit absteigenden Mengen des Komplementserums beschickt.

Von letzterem werden etwa folgende Mengen zugesetzt:

Komplementserum,	unverdünnt	. .	0,1	ccm	
„	10fach	verdünnt	0,75	„	= 0,075 Orig.-Ser.
„	„	„	0,5	„	= 0,050 „
„	„	„	0,35	„	= 0,035 „
„	„	„	0,25	„	= 0,025 „
„	„	„	0,15	„	= 0,015 „
„	„	„	0,1	„	= 0,01 „
„	„	„	0	„	= — „

Auch hier wird wieder mit Koehsalzlösung auf gleiches Volum ergänzt; dann werden die Röhrehen zwei Stunden bei 37° gehalten und das Resultat notiert. Als weiterhin zu benutzende Komplementdose wird wiederum das $1^1/_2$- bis 2fache Multiplum der eben vollkommen lösenden Komplementmenge festgesetzt.

Damit ist also das zu verwendende hämolytisehe System, bestehend aus 1 ccm Rinderblut und den eben bestimmten Mengen von Ambozeptorserum und Komplementserum fixiert. Bemerkt sei noch, daß das Ambozeptorserum so stark sein soll, daß seine vollkommen lösende Dose bei Verwendung von 0,1 ccm Meerschweinehenkomplement bei 0,001—0,0005 ccm gelegen ist.

3. Einstellung des Eiweißimmunserums (Bakterienimmunserums).

Zu diesem Zweek muß festgestellt werden, bis zu welehen Verdünnungsgraden das Immunserum noeh imstande ist, beim Zusammentreffen mit dem naehzuweisenden Antigen (als z. B. mit Menseheneiweiß oder mit Typhusbazillenextrakt) die Hämolyse in dem oben festgelegten System zu verhindern. Dies geschieht nun folgendermaßen:

Handelt es sieh z. B. um den Nachweis von menschlichem Eiweiß in einer Blutspur, so werden folgende drei Versuchsreihen angesetzt:

Reihe a) erhält je 0,1 ccm eines 100fach verdünnten Menschenser.
„ b) „ „ 0,1 „ „ 1000fach „ „
„ c) „ „ 0,1 „ physiologische Kochsalzlösung.

Außerdem erhält jedes Röhrchen der drei Reihen das früher bestimmte Komplementserum und absteigende Mengen des Immunserums, etwa in folgender Weise:

Antiserum,	unverdünnt	. .	0,1	ccm		
„	10fach	verdünnt	0,75	„	= 0,075	Orig.-Ser.
„	„	„	0,5	„	= 0,05	„
„	„	„	0,35	„	= 0,035	„
„	„	„	0,25	„	= 0,025	„
„	„	„	0,2	„	= 0,02	„
„	„	„	0,15	„	= 0,015	„
„	„	„	0,1	„	= 0,01	„
„	„	„	0	„	= —	„

Diese drei Reihen werden nun eine Stunde lang bei 37° im Brutschrank erhalten, wobei in Reihe a und b die Gelegenheit zur Komplementbindung gegeben ist; erst dann werden alle Röhrchen mit 1 ccm Blutaufschwemmung und mit der bestimmten Menge des Ambozeptorserums beschickt, auf gleiches Volumen gebracht und neuerdings auf zwei Stunden in den Brutschrank gestellt. Kontrollreihe e muß dann, da sie nur Antiserum aber kein Antigen (Menschenserum) enthält, vollkommene Hämolyse zeigen, während in den beiden anderen Reihen, wenn das Antiserum genügend wirksam ist, mehr oder weniger ausgedehnte Hemmung zu beobachten sein wird. Da man nun für den forensischen Eiweißnachweis bzw. Blutnachweis fordern muß, daß das Antiserum mindestens $^1/_{10000}$ ccm (= 0,1 ccm einer 1000-fachen Verdünnung) des Menschenserums nachzuweisen gestattet, so wird also nur ein Antiserum brauchbar sein, das auch in Reihe b kräftige Komplementablenkung, d. i. Hämolysehemmung erzeugt hat. Als Dose für den eigentlichen Versuch wählt man dann einen Wert, der nur wenig größer ist als die eben vollkommen hemmende Dosis. —

Bei seinen Versuchen über den Nachweis von Typhusbazillenantigen im Blute von Kranken hat LÜDKE (entsprechend unserer Reihe a als Menge des Bazillenextrakts 0,1 ccm verwendet; als Reihe b könnte man dann eine solche mit 0,01 ccm Extrakt ansetzen.

Damit sind die — allerdings etwas umständlichen — Vorarbeiten für den eigentlichen Ablenkungsversuch erledigt. Da jedoch alle dabei beteiligten Flüssigkeiten mit Ausnahme des Komplementserums im eingefrorenen Zustand [1]) fast beliebig lange unverändert aufbewahrt werden können, so reicht man mit einer einmaligen Titerbestimmung lange Zeit aus und hat jedesmal nur die Wertigkeit des frischen Komplementserums festzustellen, was nur geringe Mühe erfordert.

4. Ausführung des eigentlichen Ablenkungsversuchs.

In eine Reihe von Reagenzröhrchen kommen

1. die bestimmte Menge Komplementserum;
2. die bestimmte Menge des Antiserums;
3. absteigende Mengen der zu untersuchenden Flüssigkeit.

Beim forensischen Blutnachweis hätte man etwa von derselben zuzusetzen:

0,1	ccm	unverdünnt			
0,1	„	10fach	verdünnt	= 0,01	ccm
0,1	„	100 „	„	= 0,001	„
0,1	„	1000 „	„	= 0,0001	„
0,1	„	10000 „	„	= 0,00001	„
0	„	— „	„	= —	„

Beim Nachweis von Bazillensubstanz im Serum wird man größere Mengen, etwa von 1 ccm bis zu 0,001 ccm abwärts wählen.

1) Hierzu eignet sich der Gefrierapparat „Frigo“ von MORGENROTH (F. u. M. Lautenschläger. Berlin)

Nach einstündigem Aufenthalt im Brutschrank wird dann zu jedem Röhrchen noch 1 ccm Blutaufschwemmung und die festgesetzte Ambozeptormenge zugesetzt. Als Kontrollen dienen genau in gleicher Weise beschickte Röhrchen, nur ohne Antiserum. Nach weiterem zweistündigen Aufenthalt im Brutschrank müssen sämtliche Kontrollen Hämolyse aufweisen, während in der eigentlichen Versuchsreihe mehr oder weniger ausgedehnte Hemmung zu beobachten ist, wenn die Reaktion positiv verläuft.

Das Verfahren ist spezifischer als die Präzipitationsmethode, und die Gefahr heterologer Reaktionen infolge der Möglichkeit, kleine Mengen des Antiserums zu verwenden, viel geringer.

B. Nachweis von Antikörpern.

Im Serum, Zerebrospinalflüssigkeit oder Gewebe von Kranken (bei Typhus, Meningokokken-, Gonokokkenaffektionen, Pneumonie, Staphylomykosen, Syphilis).

Hierzu sind erforderlich: dieselben Gerätschaften[1]) und Flüssigkeiten, wie bei A aufgezählt, mit folgendem Unterschied:

An Stelle von **a** fungiert das auf Antikörper zu untersuchende (bei 56° inaktivierte) vollkommen klare Serum des Patienten (bzw. Spinalflüssigkeit).

An Stelle von **d** fungiert eine Lösung jenes Antigens, dessen Antikörper nachgewiesen werden sollen; also bei

1) Finkelstein (Berl. Kl. W. 1909, No. 35) hat zur Ausführung der Komplementablenkung besondere Gläschen angegeben, die aus einem trichterartigem Gefäß bestehen, an dessen unteres Ende ein mit Teilung versehenes Glasröhrchen von 40 mm Länge und 1 mm innerer Lichte angeschmolzen ist. Der Gesamtinhalt des Gläschens beträgt 7—8 ccm. Nach Verweilen im Brutschrank wird dasselbe einige Minuten lang zentrifugiert, wobei sich die ungelösten Blutkörperchen in der Kapillarröhre absetzen und die Höhe der Blutkörperchensäule als Maßstab für den Grad der Hämolyse benutzt wird.

bakteriellen Erkrankungen ein Bakterienextrakt, dessen Herstellung unter e beschrieben wurde. (e fällt dann fort.) Handelt es sich um den Nachweis von Lues bzw. von luetischen Folgeerkrankungen (Tabes, progressive Paralyse usw.), so wird ein Extrakt syphilitischer Organe benutzt.

Luesdiagnose.

1. Technik nach Wassermann-Meier. (Berliner Methode.)

Die Bereitung der Antigenlösung ist nach Michaelis [1]) folgende:

Die Leber eines syphilitischen Fötus wird im eingefrorenen Zustande beliebig lange aufbewahrt und einige Tage vor Anstellung der Versuche teilweise zu Extrakt verarbeitet. Zu diesem Zweck wird ein Teil Leber nach gründlicher Verreibung unter Zusatz von etwas Seesand mit fünf Teilen physiologischer Kochsalzlösung und $^1/_2$ Teil 5 %iger Karbolsäurelösung mehrere Stunden lang im Schüttelapparat behandelt und dann noch etwa weitere vier Tage oder länger im Eisschrank (aber nicht unter 0°) sich selbst überlassen. So wird das Extrakt auch weiterhin, ohne zu filtrieren oder zentrifugieren, aufbewahrt.

Für den eigentlichen Versuch werden dann nach Bedarf kleine Mengen durch scharfes Zentrifugieren geklärt und stellen im gebrauchsfertigen Zustand eine opaleszierende, aber von sichtbaren Inhomogenitäten freie Flüssigkeit dar, welche das Syphilisantigen enthalten soll.

Levaditi trocknet die frisch zerkleinerten Organe im Vakuum über $CaCl_2$ und H_2SO_4 und pulverisiert sie dann in sterilem Mörser. Im Bedarfsfalle wird 1 Teil des Pulvers mit 30 Teilen Kochsalzlösung verrieben, 12 Stunden im Eisschrank stehen gelassen und die nach kräftigem Zentrifugieren resultierende klare Flüssigkeit benutzt.

1) Michaelis, Berl. klin. Wochenschr. 1907.

Die Extrakte müssen folgende Bedingungen erfüllen:

1. 0,2 ccm Extrakt muß mit 0,1 ccm sicher luetischen Serums komplette Hemmung der Hämolyse geben.
2. 0,2 ccm Extrakt darf mit 0,2 ccm normalen menschlichen Serums nicht hemmen.
3. 0,5 ccm Extrakt darf auch für sich allein keine Hemmung geben, widrigenfalls er zu verdünnen ist, aber nur soweit, daß Bedingung 1 und 2 noch erfüllt bleibt.

Wegen der Veränderlichkeit mancher Extrakte beim Lagern schlagen SELIGMANN und BLUM[1]) vor, jedes Serum nicht nur mit einem, sondern mit 3—4 verschiedenen Extrakten zu prüfen.

Zur Kontrolle endlich dient Serum (Spinalflüssigkeit) eines normalen (nicht syphilitischen) sowie eines sicher syphilitischen Individuums und ein Extrakt aus der Leber eines nicht syphilitischen Kindes.

Vorausgehen muß dem eigentlichen Versuch, wie bei A, die Einstellung des Ambozeptorserums.

Dann wird die kleinste Menge des luetischen Gewebsextrakts festgestellt, die für sich allein, ohne Serumzusatz, noch Komplement bindet. Zu diesem Zweck werden 1,0, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 und 0,1 ccm Extrakt mit 0,1 ccm Komplementserum zusammengebracht, 1 Stunde stehen gelassen und darauf 1 ccm 5%ige Hammelblutaufschwemmung und die bestimmte Menge Ambozeptorserum hinzugefügt. Schließlich wird das Gesamtvolumen der Röhrchen auf 2,5 ccm durch Zusatz von Kochsalzlösung ergänzt. Die Proben kommen dann neuerdings in den Brutschrank und werden nach Ablauf von 2 Stunden besichtigt. Hemmt das Extrakt noch in Dosen von 0,5 ccm und darunter, so muß es (entsprechend Bedingung 3) verdünnt werden. In analoger Weise wird gleichzeitig ermittelt, wie groß die Extraktmenge ist, die mit 0,1 ccm sicher luetischen

1) SELIGMANN und BLUM, Berl. klin. Wochenschr. 1909, No. 24.

Serums noch komplette Hemmung gibt, um festzustellen, ob auch Bedingung 1 erfüllt ist. Ist dies der Fall, so kann der eigentliche Versuch beginnen.

Nach Wassermann[1]) und seinen Mitarbeitern verfährt man folgendermaßen: das Serum des betreffenden Patienten (bzw. die Lumbalflüssigkeit wird mit dem Komplementserum und dem Extrakt gemischt, für 1 Stunde in den Brutschrank gebracht, dann mit 1 ccm Hammelblutaufschwemmung und der festgesetzten Ambozeptormenge (siehe A 1) beschickt und das Gesamtvolumen auf 2,5 ccm ergänzt. Nach weiterem zweistündigem Aufenthalt im Brutschrank wird das Ergebnis notiert. Die zum Versuch zu verwendenden Quantitäten von Extrakt und Serum (bzw. Lumbalflüssigkeit) sind aus folgender Tabelle zu entnehmen, die

1 Stunde im Brutschrank			Zusatz von Blut und Ambozeptor; Volumen auf 2,5 ccm ergänzt; im Brutschr. 2 St.
Lumbalflüssigkeit	Extrakt	Komplement	Ergebnis
Patient: 0,2	luetisch: 0,2	0,1	Hemmung
0,2	normal: 0,2	0,1	Lösung
0,2	—	0,1	„
0,4	—	0,1	„
sicher luetisch: 0,2	luetisch: 0,2	0,1	Hemmung
0,2	normal: 0,2	0,1	Lösung
nicht luetisch: 0,2	luetisch: 0,2	0,1	Lösung
—	luetisch: 0,2	0,1	Lösung
—	„ 0,4	0,1	„
—	—	0,1	Lösung
—	—	0,1	„

1) Wassermann, Neisser, Bruck und Schucht, Zeitschr. f. Hyg. 1906, Bd. LV. Wassermann und Meier, Deutsche med. Wochenschr. 1907.

einen Versuch von Wassermann und Meier wiedergibt. Ebenso sind aus derselben die notwendigen Kontrollen ersichtlich. Nur das luetische (bzw. das Patientenserum) darf das Phänomen der Komplementablenkung aufweisen, während alle Kontrollen vollkommene Hämolyse zeigen müssen, wenn die Reaktion positiv sein soll.

Wechselmann[1]) empfiehlt, da manche luetische Sera infolge „Komplementoïdverstopfung" negativ reagieren, die Komplementoïde zu absorbieren. Zu diesem Zweck werden 0,9 ccm inaktives Serum mit 3 ccm physiologischer Kochsalzlösung und 0,6 ccm einer ca. 7 %igen Aufschwemmung frisch gefällten Baryumsulfats durchgeschüttelt und nach 1stündigem Verweilen bei 37° klar zentrifugiert. Zum Versuch dienen 1 bezw. 2 ccm des Zentrifugats (entsprechend 0,2 bezw. 0,4 ccm Serum).

2. Technik nach Taege[2]) (Breslauer Methode).

1a) Für die Herstellung des Extrakts gibt Taege folgende Vorschrift. Die Leber eines syphilitischen Fötus wird ganz fein zerhackt oder in der Fleischmaschine zerkleinert, der Brei gewogen und mit der vierfachen Menge absoluten Alkohols in einem Kolben vermischt. Das Gefäß bleibt 24 Stunden im Zimmer stehen oder es kommt in den Schüttelapparat und wird über Nacht geschüttelt. Dann wird filtriert, das Filtrat in einer flachen Schale im Vakuumapparat bei 40° C und 60 mm Hg Druck zu einer Art Salbe eingedickt. Ein Gramm der Salbe wird in 100 ccm 0,85 %iger NaCl-Lösung fein aufgeschwemmt und 24 Stunden lang im Schüttelapparat geschüttelt. Man erhält hierbei eine milchartige Emulsion, die im Eisschrank aufbewahrt wird, wobei man zur Erhöhung der Haltbarkeit 0,3 % Karbolsäure hinzufügen kann.

1) Zeitschr. f. Immunitätsf. Bd. III, 1909.
2) Münch. med. Wochenschr. 1908, No. 33.

1b) Will man die Einengung im Vakuum umgehen, so kann man auch einen Teil der zerkleinerten Leber mit 10 Teilen Alkohol absolut. versetzen und mit einigen Glasperlen 24 Stunden lang schütteln. Das Filtrat ist das fertige Leberextrakt.

Zum Gebrauch wird ein Teil des so hergestellten Extrakts mit 3 Teilen Kochsalzlösung gemischt.

2. Das fragliche Patientenserum wird mit 4 Teilen physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Ebenso das sicher luetische und das normale Vergleichserum.

3. Das Komplementserum wird mit 9 Teilen Kochsalzlösung verdünnt.

4. Das Ambozeptorserum, das im Vakuum zur Staubtrockne eingedampft und zu 0,3 g in kleine braune Röhrchen eingeschmolzen aufbewahrt wird, ist im Gebrauchsfalle in 3 ccm destillierten Wassers aufzulösen. Von dieser Lösung ist 0,1 ccm mit 60 ccm Kochsalzlösung zu verdünnen.

Zur Einstellung des hämolytischen Systems verfährt man folgendermaßen: In sechs kleine, fortlaufend numerierte Gläschen kommen je 2 ccm Kochsalzlösung. Ferner

in Röhrchen 1)	1 ccm	Ambozeptorl.	
2)	0,5 „	„	+ 0,5 ccm Kochsalzl.
3)	1 „	„	3fach verdünnt (1 ccm Ambozeptor + 2 ccm Kochs.)
4)	1 „	„	4fach verdünnt (1 ccm Ambozeptor + 3 ccm Kochs.)
5)	1 „	„	6fach verdünnt (1 ccm 3fach Verd. + 1 ccm Kochs.)
6)	1 „	„	8fach verdünnt (1 ccm 4fach. Verd. + 1 ccm Kochs.)

Zu allen Röhrchen wird schließlich noch 1 ccm Komplement und 1 ccm Blutaufschwemmung (Hammelblut) gegeben, worauf die Proben aufgeschüttelt und in den Brutschrank gestellt werden.

Röhrchen 1 soll nach 15 Min. vollkommene Hämolyse zeigen
„ 2 nach 30 Min.
„ 3 und 4 nach 30—45 Min.
„ 5 „ 6 endlich nach 2 Stunden.

Erfolgt die Hämolyse in kürzerer Zeit, so muß das Ambozeptorserum zunächst aufs Doppelte mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt werden, erfolgt sie dagegen zu langsam, so muß die Ambozeptorlösung verstärkt werden, indem nicht wie gewöhnlich 0,1, sondern 0,2 ccm der Ambozeptorstammlösung mit 60 ccm Kochsalzlösung verdünnt werden.

Zur Prüfung des Antigens werden 2 ccm desselben mit dem hämolytischen System (also 1 ccm Ambozeptor, 1 ccm Komplement, 1 ccm Blut) versetzt. Nach einstündigem Aufenthalt im Brutschrank muß vollkommene Hämolyse eingetreten sein.

Als Fehlerquelle, die möglicherweise die Versuchsresultate zu trüben imstande ist, kommt die Tatsache in Betracht, daß in seltenen Fällen normales Serum mit einem sonst brauchbaren Antigen Hemmung der Hämolyse gibt. Dagegen schützt man sich dadurch, daß man ein Antigen erst dann in Gebrauch nimmt, wenn man festgestellt hat, daß es mit 10—12 verschiedenen normalen Seren keine Komplementablenkung zu geben vermag. Ist das Antigen zu wenig wirksam, so daß es mit dem sicher luetischen Serum keine ausgesprochene Hemmung gibt, so muß durch besondere Versuche festgestellt werden, in welchen Mengenverhältnissen es dem System zuzusetzen ist, damit die Komplementablenkung zustande kommt. Da endlich luetische Sera bei längerer Aufbewahrung ihre Reaktionsfähigkeit verlieren können, so tut man gut, sich möglichst viele solche Sera in Vorrat zu halten.

Die eigentliche Untersuchung vollzieht sich in folgender Weise:

Röhrchen 1) = 1 ccm Komplement + 2 ccm Kochsalzl.
„ 2) = 1 „ „ + 1 ccm Antigen + 1 ccm normales Serum

Röhrchen 3) = 1 ccm Komplement + 1 ccm Antigen + 1 ccm sicher luetisch. Serum

„ 4) = 1 „ „ + 2 ccm Antigen + 0 ccm Serum

„ 5) = 1 „ „ + 1 ccm Antigen + 1 ccm fragl. Patientenserum

„ 6) = 1 „ „ + 0,5 ccm Ant. + 0,5 ccm fragl. Patientenserum + 1 ccm Kochs.

„ 7) = 1 „ „ + 0 ccm Antigen + 2,0 ccm fragl. Patientenserum

Nach einstündigem Aufenthalt dieser Proben im Brutschrank wird zu denselben je 1 ccm Ambozeptor und 1 ccm Hammelblutaufschwemmung hinzugesetzt, worauf sie neuerdings eine Stunde lang bei 37° gehalten werden. Nach Ablauf dieser Zeit muß Probe 1, 2, 4 und 7 vollkommene Lösung zeigen, bei Probe 3, 5 und eventuell auch 6 darf dagegen keine Hämolyse eingetreten sein.

3. Technik nach Hoehne[1]) (Frankfurter Methode).

Als Antigen dient ein alkokolischer Auszug aus der Leber hereditär syphilitischer Kinder (1 g Leber + 5 ccm Alkohol). Das Extrakt wird für jedesmaligen Gebrauch vierfach mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und kommt in dieser Verdünnung in absteigenden Mengen von 0,75—0,5—0,25 ccm zur Anwendung. Diese Extraktmengen werden mit je 1,0 ccm des 10fach verdünnten, inaktivierten, zu prüfenden Serums versetzt, während in einem vierten Röhrchen nur das letztere, aber kein Extrakt angesetzt wird. Dazu kommen je 0,5 ccm eines fünffach verdünnten Meerschweinchenserums als Komplement, worauf alle Röhrchen durch Zusatz von Kochsalzlösung auf das

1) Berl. klin. Wochenschr. 1908, No. 38.

Volumen von 2,5 ccm gebracht werden. Man erhält somit folgendes Schema:

A. Hauptversuch.

Röhrchen 1) 0,75 ccm Extr. + 1 ccm fragl. Serum 10fach verdünnt + 0,5 ccm Meerschw.-Ser. 5fach verd. + 0,25 ccm Kochs.

„ 2) 0,5 ccm Extr. + 1 ccm fragl. Serum 10fach verdünnt + 0,5 ccm Meerschw.-Ser. 5fach verd. + 0,5 ccm Kochs.

„ 3) 0,25 ccm Extr. + 1 ccm fragl. Serum 10fach verdünnt + 0,5 ccm Meerschw.-Ser. 5fach verd. + 0,75 ccm Kochs.

„ 4) 0 ccm Extr. + 1 ccm fragl. Serum 10fach verdünnt + 0,5 ccm Meerschw.-Ser. 5fach verd. + 1,0 ccm Kochs.

B. Kontrollen.

„ 5) 2 ccm fragliches Serum 10fach verdünnt + 0,5 ccm Meerschw.-Ser. 5fach verd.

„ 6) 1,5 ccm Extr. + 0,5 ccm Meerschw.-Ser. 5fach verd. + 0,5 ccm Kochs.

„ 7) 1,0 ccm Extr. + 0,5 ccm Meerschw.-Ser. 5fach verd. + 1,0 ccm Kochs.

„ 8) 0,75 ccm Extr. + 0,5 ccm Meerschw.-Ser. 5fach verd. + 1,25 ccm Kochs.

„ 9) 0,5 ccm Extr. + 0,5 ccm Meerschw.-Ser. 5fach verd. + 1,5 ccm Kochs.

C. Kontrollen

mit sicher luetischem und sicher normalem Serum wie bei A.

Nach $1^1/_4$ stündigem Aufenthalt der Proben bei 37° wird 0,5 ccm einer geeigneten, täglich frisch einzustellenden, Ambozeptorverdünnung ($2^1/_2$—3 komplettlösende Dosen) und 1 ccm Hammelblutaufschwemmung (5%) hinzugefügt und weitere 2 Stunden bei 37° C bebrütet.

Röhrchen 1, 2 und 3 muß mehr oder minder ausgesprochene Hemmung der Hämolyse aufweisen, 4—9 dagegen vollkommene Hämolyse zeigen, wenn die Reaktion als positiv gelten soll.

4. Vereinfachte und verfeinerte Technik nach Stern[1]).

(Breslauer Methode.)

Zu derselben sind erforderlich:

1. Organextrakt aus syphilitischer Leber, wie S. 67, 1 b) beschrieben, im Verhältnis 1 : 9 mit Alkohol absolut. hergestellt. Zum Gebrauch wird das Extrakt 10fach mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt.
2. 2,5 %ige Aufschwemmung von gewaschenen Hammelblutkörperchen.
3. Das zu untersuchende Patientenserum im **aktiven** Zustand; dasselbe dient gleichzeitig als Komplementquelle, wodurch die Benutzung von Meerschweinchenkomplement überflüssig wird. Auch 48 Stunden altes, von auswärts eingesandtes, ja selbst Leichenserum kann günstigenfalls noch benutzt werden.
4. Ambozeptorserum gegen Hammelblut. Dasselbe wird derart verdünnt, daß es in 1 ccm die 5—6fach lösende Dosis für 1 ccm der 2,5 %igen Hammelblutlösung enthält.
5. Zur Kontrolle sicher normales und sicher luetisches Serum im aktiven Zustand.

Ausführung.

Röhrchen 1)	0,2 ccm	Patientenser.	+	1,0 ccm	Luesextrakt 10fach verd.
„ 2)	0,2 „	„	+	0,5 „	„ „ „
„ 3)	0,2 „	„	+	1,0 „	physiol. NaCl
„ 4)	0,2 „	Normalserum	+	1,0 „	Luesextrakt 10fach verd.
„ 5)	0,2 „	„	+	0,5 „	„ „ „
„ 6)	0,2 „	„	+	1,0 ccm	physiol. NaCl
„ 7)	0,2 „	Luesserum	+	1,0 „	Luesextrakt 10fach verd.
„ 8)	0,2 „	„	+	0,5 „	„ „ „
„ 9)	0,2 „	„	+	1,0 „	physiol. NaCl
„ 10)	1,0 „	physiol. NaCl	+	1,0 „	Luesextrakt 10fach verd.

1) Zeitschr. f. Immunitätsforschung, Bd. I, H. 3.

Alle Röhrchen werden durch Zusatz von Kochsalzlösung auf das Volumen von 2 ccm gebracht und für 1 Stunde bei 37° gehalten; hierauf erfolgt Zusatz von 1 ccm 2,5 %iger Hammelblutaufschwemmung und von 1 ccm Ambozeptorlösung und neuerliches Einbringen in den Brutschrank. Schon nach $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde sind meist die Kontrollen gelöst; die Proben werden nun herausgenommen und bleiben noch weiter 1—$1^1/_2$ Stunde bei Zimmertemperatur stehen.

Röhrchen, die sich vollkommen oder sehr stark nachgelöst haben, sind als negativ anzusehen; geringe Nachlösung, bei großer, intakter Blutkörperchenkrippe gilt als positiv.

Soll das Patientenserum als luetisch bezeichnet werden, so muß Röhrchen 1, 2, 7 und 8 Hemmung der Hämolyse aufweisen, 3, 4, 5, 6, 9 und 10 dagegen vollkommene Lösung der Blutkörperchen zeigen.

Die allerdings noch spärlichen Erfahrungen mit dieser Methode lauten meist günstig. Sie scheint beträchtlich feiner zu sein als die ursprüngliche WASSERMANNsche Methode. Unspezifische Hemmungen wurden bei kachektischen Kranken beobachtet!

5. Vereinfachte Technik nach BAUER[1]).

Zu derselben sind erforderlich:

1. Frisches Meerschweinchenserum als Komplement; das selbe wird 10fach mit Kochsalzlösung verdünnt.
2. Organextrakt. Die Leber eines luetischen Fötus oder Säuglings wird zerrieben und mit der 10fachen Menge absoluten Alkohols über Nacht geschüttelt. Das klare Zentrifugat dient als Stammlösung und ist dauernd haltbar. Zum Gebrauch wird es im Verhältnis 1 : 4 mit physiologischer Kochsalzlösung gemischt. Man prüft dann, ob 1,0 ccm die Hämolyse von 1,0 ccm

1) Deutsche med. Wochenschr. 1908, No. 16.

Hammelblut durch 0,2 menschlichen Normalserums und 0,1 Meerschweinchenserum nicht hemmt. Sollte dies der Fall sein, so muß das Extrakt stärker verdünnt werden.

3. 5 %ige Aufschwemmung von gewaschenen Hammelblutkörperchen.
4. Das zu untersuchende Blutserum, $^1/_2$ Stunde auf 56° C. erhitzt.
5. Sicher luetisches und sicher normales Blutserum, ebenfalls inaktiviert. Im übrigen werden dieselben Geräte benötigt, wie unter A g—k aufgezählt. Da hier die Normalambozeptoren des Menschenserums für Hammelblut zur Hämolyse benutzt werden, entfällt der Zusatz eines spezifischen Immunambozeptorserums.

Ausführung.

Röhrchen 1 erhält: 0,2 ccm Patientenserum + 1,0 ccm Organextrakt + 1 ccm Meerschw.-Serum 10fach verdünnt

„ 2 „ 0,2 ccm Patientenserum + 1,0 ccm Kochsalzlösung + 1 ccm Meerschw.-Serum 10fach verdünnt

„ 3 „ 0,2 ccm Normalserum + 1,0 ccm Organextrakt + 1 ccm Meerschw.-Serum 10fach verdünnt

„ 4 „ 0,2 ccm Normalserum + 1,0 ccm Kochsalzlösung + 1 ccm Meerschw.-Serum 10fach verdünnt

„ 5 „ 0,2 ccm Luesserum + 1,0 ccm Organextrakt + 1 ccm Meerschw.-Serum 10fach verdünnt

„ 6 „ 0,2 ccm Luesserum + 1,0 ccm Kochsalzlösung + 1 ccm Meerschw.-Serum 10fach verdünnt.

Die Röhrchen kommen auf $^1/_2$ Stunde in den Brutschrank, worauf sie mit 1 ccm der Hammelblutaufschwemmung beschickt werden. Nach weiterem $^1/_2$—1stündigen Aufenthalt im Brutschrank muß Röhrchen 1 und 5 Hemmung der Hämolyse aufweisen, 2, 3, 4 und 6 dagegen vollkommene Lösung zeigen. Nur komplette Hemmungen sind als positive Reaktion aufzufassen.

Stehen größere Serummengen zur Verfügung, so sind mehrere Proben mit variierenden Quantitäten des fraglichen Patientenserums anzusetzen. Bei jungen Säuglingen und bei ca. 10% der Erwachsenen mißlingt die Reaktion, weil in deren Serum die Normalambozeptoren gegen Hammelblut fehlen. Man ersetzt dieselben durch Hinzufügen einer gleichen Menge menschlichen Normalserums, das man ja zur Kontrolle vorrätig hat. Lipämisches Serum ist unbrauchbar, weshalb es geboten ist, das Blut bei dem nüchternen Patienten zu entnehmen. In letzter Zeit sind eine Reihe von Bedenken gegen die Bauersche Methodik geäußert worden, deren Berechtigung erst die weitere Erfahrung erweisen muß.

6. Vereinfachte Technik nach Tschernogubow[1]).

Zu derselben ist erforderlich:

1. Hämolytisches Immunserum (von Kaninchen) gegen Menschenblut. (Ambozeptorserum).
2. Extrakt aus syphilitischer Leber als Antigen. Die zerkleinerte Leber eines kongenital syphilitischen Fötus wird getrocknet, pulverisiert und nach Bedarf 0,5 g dieses Pulvers 12—15 Stunden lang im Eisschrank mit 25 ccm 95%igen Alkohols extrahiert. Zum Gebrauch wird das Extrakt mit physiolog. Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 50—200 verdünnt.
3. Blut des Patienten, das gleichzeitig als Quelle des Komplements, als Blutkörperchenaufschwemmung und als Quelle der luetischen Antikörper fungiert. Man macht einen Einstich in den Finger und entnimmt mittels einer Pipette oder mit dem Zeissschen Blutmischer für die weißen Blutkörperchen

1) Berl. klin. Wochenschr. 1908, No. 47.

4mal je 0,1 ccm Blut, welches sofort mit 1 ccm der gleich zu nennenden Flüssigkeiten gemischt und in 4 enge Röhrchen eingetragen wird. Und zwar kommt in

Röhrchen 1 und 2: 0,1 Blut + 1,0 physiol. Kochsalzl.
„ 3 „ 4: 0,1 „ + 1,0 verdünnten Leberextraktes.

4. Im übrigen dieselben Geräte wie unter A, g—k aufgezählt.

Ausführung.

Die 4 mit Blut und Extrakt bezw. Kochsalzlösung beschickten Röhrchen kommen für 1 Stunde in den Thermostaten. Sodann werden in die Röhrchen 1 und 3 je 0,25 ccm Ambozeptorserum eingetragen, während zu 2 und 4 je 0,25 ccm Kochsalzlösung hinzugefügt werden, worauf die Röhrchen aufs neue für 2 Stunden in den Brutschrank gestellt werden und schließlich in den Eisschrank kommen. Am nächsten Morgen wird das Resultat notiert.

Röhrchen 1 muß Hämolyse aufweisen, 2 dagegen nicht, wenn der Versuch brauchbar sein soll. Denn 2 enthält zwar Komplement, aber keinen Ambozeptor.

Ist diese Bedingung erfüllt und zeigt ferner 3 eine Hemmung der Hämolyse während 4 vollkommene Lösung aufweist, so ist die Reaktion als positiv zu betrachten.

Die verschiedenen, geschilderten Verfahren der Komplementablenkung haben sich zum Teil bereits außerordentlich bewährt. Auffallenderweise hat sich aber herausgestellt, daß die Reaktion auch mit normalem Leberextrakt, wenn auch weniger markant, gelingt, ja sogar auch mit Extrakt aus Herzmuskel vom Meerschweinchen, so daß ihre theoretische Grundlage trotz ihrer praktischen Brauchbarkeit zweifelhaft geworden ist.

Nach Landsteiner, Müller und Poetzl[1]) läßt sich infolgedessen die Serodiagnostik der Lues vereinfachen:

7. Technik nach Landsteiner, R. Müller und Poetzl.

An Stelle des Extraktes aus luetischem Gewebe tritt folgende Flüssigkeit: 1 g Herzmuskel vom Meerschweinchen wird mit der Schere zerkleinert und in der Reibschale mit etwas Quarzsand verrieben. Der feine Brei wird in ein Glaskölbchen gebracht und mit 50 ccm 95%igen Alkohols gut durchgeschüttelt, darauf 2 Stunden bei 60° digeriert. Während dieser Zeit wird noch einige Male durchgeschüttelt, dann wird durch ein Papierfilter filtriert und die Flüssigkeit bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Im übrigen sind dieselben Flüssigkeiten und Geräte erforderlich wie, oben. Nur wurde von Müller Schafblut, und zwar in 50%iger (nicht 5%iger Aufschwemmung benutzt. —

In jedes Reagenzröhrchen kommen nun zuerst 10 Tropfen physiol. Kochsalzlösung und 1 Tropfen Komplementserum. Dazu ferner:

in Röhrchen 1) 1 Tropfen des inaktiven zu prüfenden Patientenserums;
„ 2) 1 Tropfen Patientenserum + 2 Tropfen Herzmuskelextrakt;
„ 3) 1 Tropfen inaktiven, sicher luetischen Serums;
„ 4) 1 Tropfen luetischen Serums + 2 Tropfen Extrakt;
„ 5) 1 Tropfen inaktiven normalen Serums;
„ 6) 1 „ „ „ „ + 2 Tropfen Extrakt;
„ 7) 2 Tropfen Extrakt.

Nach einstündigem Aufenthalt bei 37° C wird je 1 Tropfen der Blutaufschwemmung und die doppelt lösende Dose des Ambozeptorserums hinzugesetzt, neuerdings 1½ Stunde bei 37° bebrütet und dann das Ergebnis notiert.

1) Landsteiner, Poetzl u. Müller, Wiener klin. Wochenschrift 1907. R. Müller, Wiener klin. Wochenschr. 1908.

VII. Antihämolytische Reaktionen.

Hemmung der Cobragifthämolyse.

[„Psychoreaktion" von Much und Holzmann[1]).]

Prinzip: Das Serum mancher Geisteskranken besitzt die Eigenschaft, die hämolytische Wirkung des Cobragiftes zu neutralisieren. Die klinische Bedeutung der Reaktion ist noch nicht klargestellt.

Erforderlich sind:

a) Cobragiftlösung. 0,2 g Cobragift werden in 10 ccm Aqua destill. gelöst, zur Lösung 10 ccm Glyzerin hinzugesetzt, und das Gemisch als Stammlösung im Eisschrank aufbewahrt.

b) Defibriniertes Menschenblut (Plazentarblut), mehrfach mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und zu 10 % in Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Das Blut darf nur frisch verwendet werden.

c) Serum des Patienten (inaktiviert, $^1/_2$ Stunde bei 55 °). Erforderlich ca. 1,5—2 ccm.

d) Kleine Reagenzgläser von 6—7 mm Durchmesser.

e) Pipetten zu 1 ccm Inhalt, in $^1/_{10}$ ccm geteilt.

f) Physiologische Kochsalzlösung.

g) Ein auf 37 ° C eingestellter Thermostat.

Ausführung.

Zunächst stellt man sich aus der 1 %igen Cobragiftstammlösung durch 50fache Verdünnung (etwa durch Mischen von 0,2 ccm Cobragiftlösung mit 9,8 ccm Kochsalzlösung) die Versuchslösung her. Dann bringt man in eine Reihe von Reagenzgläschen je 0,35 ccm Patientenserum und 1,0, 0,5, 0,25 und 0,1 ccm des verdünnten Cobragiftes. Schließ-

1) Much u. Holzmann, Münchn. med. Wochenschr. 1909, No. 20. Omorokow, Berl. klin. Wochenschr. 1909, No. 41.

lich kommt in jedes Gläschen 0,5 ccm Blutaufschwemmung, worauf das Gesamtvolumen mit Kochsalzlösung auf 1,85 ccm ergänzt wird. Als Kontrollen dienen Röhrchen ohne Serum. Es erhält somit:

Röhrchen	1)	0,35	Serum	+ 1,0	Cobragift	+ 0,5	Blut	+ 0	Kochsalzl.
„	2)	0,35	„	+ 0,5	„	+ 0,5	„	+ 0,5	„
„	3)	0,35	„	+ 0,25	„	+ 0,5	„	+ 0,75	„
„	4)	0,35	„	+ 0,1	„	+ 0,5	„	+ 0,9	„
„	5)	0	„	+ 1,0	„	+ 0,5	„	+ 0,35	„
„	6)	0	„	+ 0,5	„	+ 0,5	„	+ 0,85	„
„	7)	0	„	+ 0,25	„	+ 0,5	„	+ 1,1	„
„	8)	0	„	+ 0,1	„	+ 0,5	„	+ 1,25	„

Nach gründlichem Durchmischen kommen die Röhrchen für 2 Stunden in den Brutschrank und werden dann weitere 22 Stunden auf Eis gestellt. Vor der Besichtigung werden alle Röhrchen gründlich aufgeschüttelt. Soll die Reaktion positiv sein, so muß jenes der mit Serum beschickten Röhrchen, das die kleinste noch eben lösende Cobragiftdosis enthält, vollkommen undurchsichtig sein, also Hemmung der Hämolyse zeigen. (Ist beispielsweise in Röhrchen 5, 6 und 7 Lösung eingetreten, 8 aber ungelöst, also die eben lösende Cobragiftdosis 0,25, dann muß Röhrchen 3, das dieselbe Giftdosis enthält, Hemmung aufweisen.)

VIII. Antifermentative Reaktionen.

Bestimmung der antitryptischen Kraft des Blutes.

Prinzip: Es wird ermittelt, welche Trypsinmenge durch eine bestimmte Serum- oder Blutquantität in ihrer verdauenden Wirkung eben neutralisiert wird. Als Objekt der tryptischen Wirkung dient entweder die in der Bakteriologie übliche Löfflersche Serumplatte, oder eine Kaseinlösung. Als Kriterium der eingetretenen Verdauung dient im ersteren Fall das Erscheinen einer Delle

auf der Serumfläche, im letzteren das Ausbleiben einer Trübung (Kaseinfällung) bei Essigsäurezusatz.

1. Methode nach Marcus[1]).

[Modifizierte Methode von Müller und Jochmann[2]).]

Hierzu sind erforderlich:

1. Trypsinlösung: 0,1 g Trypsin (von Kahlbaum, Berlin) wird mit einem Gemisch von 5 ccm unverdünntem Glyzerin und 5 ccm destilliertem Wasser in einem Reagenzglas gut durchgeschüttelt, dann $^1/_2$ Stunde lang bei 55° gehalten und die Lösung nach erneutem Durchschütteln filtriert. Die Lösung ist lange haltbar.
2. Löfflersche Serumplatten (11—12 Stück). Das Gemisch von 3 Teilen sterilem Rinder- oder Hammelserum und 1 Teil leicht alkalischer Bouillon, die neben 1 % Pepton und 0,5 % NaCl noch 1 % Traubenzucker enthält, wird in sterile Petrischalen ausgegossen und bei 90—95° erstarren gelassen. Die Platten dürfen nicht sofort nach ihrer Herstellung benutzt werden, sondern erst nach mehrtägigem Stehen bei Zimmertemperatur, wenn sie ihr Kondenswasser abgegeben und eine elastisch feste Oberflächenschicht bekommen haben.
3. Blut bzw. Serum des betreffenden Patienten, 3 bis 4 Stunden nach der letzten Mahlzeit entnommen. Wenige Tropfen genügen.
4. Ein auf 37° eingestellter Thermostat.
5. Schälchen oder hohle Objektträger zum Auffangen des Blutes und zum Herstellen der Serumtrypsingemische.
6. Eine Platinöse.

---

1) Marcus, Berl. klin. Wochenschr. 1908, Nr. 14 u. 1909, Nr. 4.

2) Müller u. Jochmann, Münch. med. Wochenschr. 1906, Nr. 29 u. 31.

Ausführung.

Es kann sowohl das Blutserum wie das ganze Blut zum Versuch benutzt werden. Soll Blut zur Verwendung kommen, so werden ein Paar Tropfen desselben auf einem hohlen Objektträger oder Glasschälchen aufgefangen und können sofort zur Beschickung der Löfflerplatten dienen.

Zu diesem Zweck stellt man sich Mischungen von Trypsinlösung und dem zu untersuchenden Serum bzw. Blut in verschiedenen Mengenverhältnissen her, etwa: je 1 Öse Serum bzw. Blut mit $^1/_2$, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 und 10 Ösen der Trypsinlösung. Von jeder dieser Mischungen, die in kleinen Schälchen bereitet werden, kommen 6 bis 8 Ösen getrennt auf eine Serumplatte. Eine Testplatte erhält nur Trypsinlösung ohne Serum bzw. Blut.

Sämtliche Platten werden dann in den Brutschrank gebracht, wo sie durch 5 Stunden belassen werden. Nach Ablauf dieser Zeit finden sich da, wo die Trypsinwirkung durch das Serum nicht vollkommen paralysiert worden war, flache Dellen auf der Oberfläche der Löfflerplatten. Ist z. B. bei dem Gemisch von 1 Teil Blut mit 3 Teilen Trypsinlösung noch Dellenbildung eingetreten, bei dem Gemisch von 1 Teil Blut mit 2 Teilen Trypsinlösung dagegen ausgeblieben, so wird dem Blut ein Titer von 3:1 zugeschrieben. Durch Vergleich des so bestimmten Titers mit dem von normalen Blutproben erfährt man schließlich, ob die antitryptische Kraft im speziellen Falle normal, vermehrt oder vermindert ist. (Je mehr Trypsinlösung zur Dellenbildung nötig war, je höher also der Titer, desto größer die antitryptische Kraft des Blutes.)

2. Technik nach v. Bergmann und Meyer[1]).

Zur Anstellung der Reaktion sind erforderlich:

1. 1 $^0/_{00}$ige Lösung von Trypsin sicc. (Grübler): 0,5 g Trypsin werden mit 50 ccm physiolog. Kochsalzlösung

1) Berl. klin. Wochenschr. 1908, Nr. 37.

versetzt und nach Zusatz von 0,5 ccm Normalsodalösung auf 500 ccm aufgefüllt.

2. Kaseinlösung. 1 g Kasein (Rhenania) wird unter leichtem Erwärmen in 100 ccm $^{n}/_{10}$ NaOH-Lösung gelöst, dann mit $^{n}/_{10}$ HCl-Lösung gegen Lackmus neutralisiert und mit physiolog. Kochsalzlösung auf 500 ccm aufgefüllt.
3. Essigsäurelösung: 5 ccm Essigsäure + 45 ccm Alkohol + 50 ccm Wasser.
4. Das Patientenserum, 20fach mit Kochsalzlösung verdünnt; 0,1—0,2 ccm Serum genügen.
5. Kleine Reagenzröhrchen.
6. Pipetten zu 2 ccm, in Zehntelkubikzentimeter geteilt.

Ausführung.

a) Wertbestimmung der Trypsinlösung, die dem eigentlichen Versuch vorangehen muß.

In eine Reihe von Reagenzröhrchen werden je 2 ccm Kaseinlösung gebracht und dazu fallende Mengen der Trypsinlösung zugesetzt (etwa: 1,0, 0,9, 0,8, 0,7 . . . . 0,2 ccm). Nach sorgfältigem Durchschütteln kommen die Röhrchen für $^{1}/_{2}$ Stunde in den Brutschrank. Nun wird tropfenweise mit Essigsäure angesäuert und festgestellt, bei welchem Röhrchen nach einigen Minuten eben noch eine Trübung eingetreten ist. Das erste vollkommen klar bleibende Röhrchen liefert die „komplett verdauende" Dosis, welche dem eigentlichen Versuch zugrunde liegt.

b) Antitrypsinbestimmung.

In eine Reihe von 6 Röhrchen kommen je 0,2 ccm 20fach verdünnten Serums; ferner steigende Mengen Trypsinlösung, beginnend mit der komplett verdauenden Dose und um je 0,1 ccm ansteigend; endlich je 2 ccm Kaseinlösung, worauf auf gleiches Volum aufgefüllt wird. Die Röhrchen kommen, wie früher, auf $^{1}/_{2}$ Stunde in den Brut-

schrank, werden dann in der geschilderten Weise angesäuert und neuerdings festgestellt, in welchem Röhrchen die Trübung beginnt. Man erfährt auf diese Weise, welche Menge der Trypsinlösung durch das Serumantitrypsin paralysiert wurde. War beispielsweise die komplett verdauende Dose 0,7 ccm, und war bei Gegenwart von Serum erst bei 2,0 ccm Trypsinlösung vollkommene Verdauung eingetreten, so waren also 2,0 — 0,7 = 1,3 ccm Trypsinlösung durch die angewendete Serummenge (0,2 einer 20 fachen Verdünnung = 0,01 ccm Vollserum) paralysiert worden. 1,0 ccm Serum paralysiert demgemäß 130 ccm Trypsinlösung. Nach FÜRST[1]) schreibt man dies Resultat:

$$\text{Anti T}\ \frac{37^{0}}{{}^{1}/_{2}\ \text{St.}} = 130.$$

Der Vergleich dieses so gewonnenen Wertes mit dem normaler Sera zeigt, ob die antitryptische Kraft des untersuchten Blutes verändert ist.

IX. Phagozytäre Reaktionen.

Bestimmung der opsonischen Kraft eines Serums nach Wright.

1. Technik nach BINE und LISSNER[2]).

Prinzip: Werden Leukozyten mit Bakterien und einem opsonisch wirkenden Serum zusammengebracht, so findet Phagozytose statt, deren Grad durch Auszählung der aufgenommenen Bakterien bestimmt werden kann.

Hierzu sind erforderlich:

a) Das zu untersuchende Serum des Patienten. Das Serum gewinnt WRIGHT mit Hilfe eines kleinen Glas-

1) Berl. klin. Wochenschr. 1909, Nr. 2.
2) BINE u. LISSNER, Münchner med. Wochenschr. 1907.

röhrchens von der in Fig. 6 abgebildeten Form. Nach kräftigem Schwingen des linken Armes wird das Grundglied des Daumens rasch mit einem Tuch umschnürt; dann werden beide Enden des Röhrchens abgebrochen, das Blut bei *A* angesogen und dann das Ende *B* etwa 4—5 cm unterhalb der Ampulle des Röhrchens vorsichtig abgeschmolzen. Natürlich muß dabei jede stärkere Erwärmung des Blutes unbedingt vermieden werden. Hat sich dann beim Erkalten des abgeschmolzenen Endes das Blut weiter in das Glasröhrchen zurückgezogen, so kann auch bei *A* abgeschmolzen werden und nun, nach erfolgter Gerinnung des Blutes, das Röhrchen mit

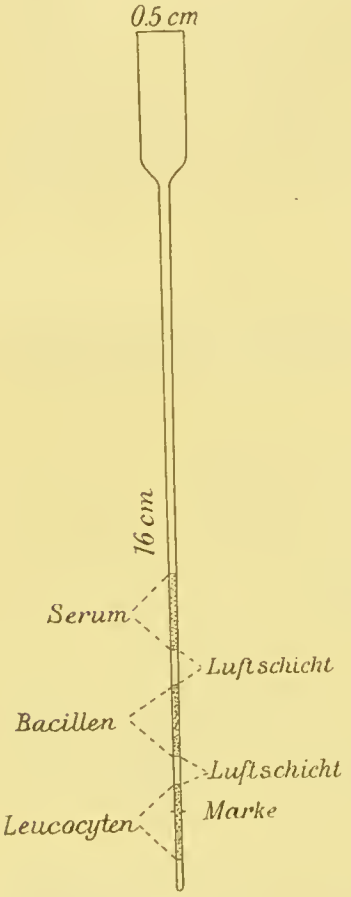

Fig. 7.

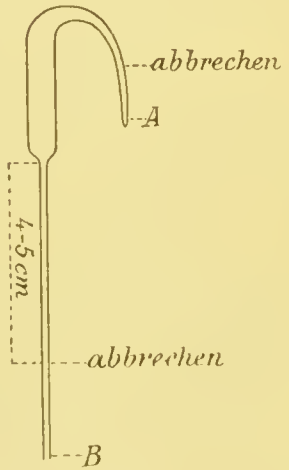

Fig. 6.

dem gebogenen Ende an den Rand eines Zentrifugengläschens angehängt werden. Hat sich durch kräftiges

Zentrifugieren das Serum vom Blutkuchen getrennt, so wird das gebogene Ende des Röhrchens abgeschnitten und das Serum mit Hilfe einer Glaskapillare entnommen.

Natürlich kann das Serum auch in beliebiger anderer Weise gewonnen werden;

b) Serum normaler Individuen als Kontrolle;

c) gewaschene Blutkörperchen. Einige Blutstropfen eines gesunden Individuums werden in ein kleines Glasröhrchen gebracht, das zu $^2/_3$ mit einer, jedesmal frisch herzustellenden, 1,5 %igen Lösung von zitronensaurem Natron gefüllt ist. Nach gründlicher Mischung (nicht schütteln!) werden die (weißen und roten) Blutkörperchen abzentrifugiert, die klare Flüssigkeit abgegossen und durch 0,85 %ige Kochsalzlösung ersetzt, worauf neuerdings zentrifugiert wird. Nachdem die Hauptmasse der Kochsalzlösung entfernt wurde, verteilt man die Blutkörperchen durch Schütteln in dem Rest der Flüssigkeit und hat hiermit die gebrauchsfertige Aufschwemmung hergestellt, die natürlich auch jedesmal erneuert werden muß, da sich die Zellen schon bei mehrstündigem Stehen verändern;

d) eine Emulsion der betreffenden Bakterienart, welcher gegenüber die opsonische Kraft des Serums bestimmt werden soll.

Ihre Herstellung ist je nach der Bakterienart verschieden. Für Untersuchungen an Tuberkulösen wird empfohlen, die getrockneten abgetöteten Bazillen zu benutzen, die von den Höchster Farbwerken zu beziehen sind. Nachdem eine geringe Quantität dieses Präparates in einem Achatmörser zu einem feinen Pulver zerstoßen wurde, zerreibt man dasselbe unter tropfenweisem Zusatz von 1,5 %iger Kochsalzlösung zu einer dickflüssigen Emulsion, die dann eine Stunde lang bei 60° sterilisiert wird. Sie kann, am besten in einem Glasröhrchen, dessen unteres geschlossenes Ende dünn ausgezogen ist, aufbewahrt werden, hält sich aber höchstens 10 Tage lang. In dem dünnen Teile setzen

sich dann etwaige gröbere Bakterienklümpchen ab und können durch Abschneiden des Röhrchens entfernt werden.

Von anderen Bakterienarten benutzt man meist eine Öse 12—24stündiger Agarkultur, in wenig physiologischer Kochsalzlösung verrieben, und dann durch weiteren Zusatz dieser Flüssigkeit verdünnt. Nach STRUBELL[1]) ist es zweckmäßig bei coliformen Bakterien und bei gramnegativen Kokken 4—10 Stunden alte Kulturen zu verwenden. Als Verdünnungsflüssigkeit für die Emulsionen des Tuberkelbazillus und der gramnegativen Kokken soll man 1,5 %ige Kochsalzlösung benutzen. Streptokokkenemulsionen müssen manchmal kräftig geschüttelt werden, um homogen zu werden. — Zur Entfernung von Bakterienhäufchen zentrifugiert man die Aufschwemmung kurze Zeit und gießt vorsichtig von dem Bodensatz ab.

Vor dem Gebrauch muß die Bakterienemulsion noch darauf geprüft werden, ob sie eine genügende Zahl von Bazillen enthält. Nach WRIGHT soll dieselbe ca. 7—10 Milliarden in 1 ccm betragen. Man kann dies leicht feststellen, indem man etwa gleiche Volumina Blut und Bakterienemulsion mischt und einen Tropfen des Gemisches auf dem Objektträger ausstreicht, fixiert und färbt. Da in 1 ccm Blut etwa 5 Milliarden Erythrozyten enthalten sind, so müssen dann also auf ein rotes Blutkörperchen im Gesichtsfeld durchschnittlich zwei Bakterien kommen. Ist deren Zahl größer, so ist die Emulsion entsprechend zu verdünnen;

c) Kapillarröhrchen, welche durch Ausziehen über der Bunsenflamme aus Glasröhrchen von ca. $^1/_2$ cm Durchmesser hergestellt werden. Der kapillare Teil soll 16 cm lang sein. (Fig. 7.) Das obere weite Ende des Röhrchens ist mit einer Gummikappe armiert;

f) Objektträger, die gut gereinigt, ausgeglüht und durch Abreiben mit Schmirgelpapier etwas rauh gemacht wurden. — Deckgläschen;

1) Deutsche med. Wochenschr. 1908, No. 19.

g) ein sog. Ausbreiter, d. i. ein Objektträger, dessen schmale Seite etwas konkav ausgebuchtet ist, zum Anfertigen des Ausstrichpräparates;

h) gesättigte Sublimatlösung zur Fixierung des Ausstrichpräparates;

i) Karbolfuchsin nach Ziehl-Neelsen (für Tuberkelbazillen), oder Karbolthionin, Eosin-Methylenblau nach May-Grünwald usw.;

j) ein Mikroskop mit homogener Immersion;

k) ein Brutschrank, auf 37° eingestellt;

l) ein Bunsenbrenner;

m) eine Glasfeile.

Ausführung.

An der Kapillare wird etwa in Entfernung von 2—3 cm vom Ende eine Marke angebracht. Mit Hilfe der Saugkappe wird zunächst das zu prüfende Serum bis zu dieser Marke angesaugt, dann etwas Luft nachgesaugt; dann folgt — wieder bis zur Marke — die Blutaufschwemmung und neuerdings etwas Luft; und schließlich wird auch von der Bakterienaufschwemmung bis zur Marke nachgesaugt. So enthält also die Kapillare gleiche Volumina der drei Flüssigkeiten durch je eine kleine Luftblase getrennt. (Fig. 7) Die Kapillare wird sofort gegen einen Objektträger oder vielleicht zweckmäßiger auf den Boden eines engen Reagenzglases ausgeblasen, die Flüssigkeit auf demselben möglichst rasch und gründlich gemischt, wieder angesaugt und nun das untere Ende — natürlich ohne den Inhalt des Röhrchens zu erhitzen, abgeschmolzen. In genau der gleichen Weise wird auch die Kontrolle mit dem normalen Serum hergestellt.

Die gefüllten Kapillaren kommen nun für 20—30 Minuten in den Brutschrank.

Nach Ablauf dieser Zeit wird das zugeschmolzene Ende des Röhrchens abgeschnitten und der Inhalt zur Unter-

suchung benutzt, indem ein Tropfen desselben mit Hilfe des „Ausbreiters“ auf dem Objektträger, ohne einen Druck auszuüben, ausgestrichen wird. (Am Ende des Ausstrichs, wo die Schicht am dünnsten ist, liegen erfahrungsgemäß die meisten Leukozyten beisammen.) Saathoff findet es zweckmäßiger, den Inhalt der Kapillare auf den Objektträger auszublasen und mit einer Platinöse gründlich zu mischen.

Nach dem Lufttrockenwerden mit durch 2—3 Minuten in der Sublimatlösung fixiert und dann gefärbt.

Nun schreitet man zur Bestimmung der phagozytischen Zahl durch Auszählung der Bakterien in mindestens 100 Leukozyten, wobei in der Mischung etwa 2—8 Bazillen auf einen Phagozyten kommen sollen. Sind weniger oder mehr Bakterien vorhanden, so ist die Zählung schwieriger, bzw. ungenau. Berechnet man nun aus den notierten Zahlen die durchschnittlich von einem Leukozyten aufgenommene Menge von Bakterien, so erhält man die phagozytische Zahl. Als Norm wird dabei jener Wert angenommen, der sich bei der Untersuchung von mindestens drei gesunden Personen im Mittel ergibt. Um sicher zu sein, daß stets eine gleich dichte Bakterienemulsion benutzt wird, schlagen Bine und Lissner vor, man solle jedesmal vor deren Verwendung mit seinem eigenen (normalen) Serum die phagozytische Zahl bestimmen, wobei sich dann stets gleiche Werte ergeben müssen.

Die phagozytische Zahl des betreffenden Patienten geteilt durch die normale phagozytische Zahl liefert dann den opsonischen Index des Patienten.

Schon kleine Abweichungen von der vorgeschriebenen Technik beeinflussen das Resultat sehr stark und machen die Resultate unzuverlässig!

Meist wird die Opsoninbestimmung zur klinischen Beurteilung des Krankheitszustandes bei infektiösen Prozessen und zum Zweck der fortwährenden Kontrolle therapeutischer

WELLCOME LIBRARY INSTITUTE

Maßnahmen, speziell der Wrightschen Bakterieneinspritzungen, vorgenommen; sie kann aber auch rein diagnostischen Zweeken dienstbar gemaeht werden. Hierfür gelten folgende Regeln [naeh Sauerbeck [1])]:

Ist der opsonisehe Index einer bestimmten Bakterienart gegenüber normal, so ist eine Infektion mit demselben ausgesehlossen. Ist der Index dauernd herabgesetzt, so handelt es sieh um einen lokalen Prozeß, ist er dauernd erhöht, so ist die Infektion überwunden oder eine künstliehe Impfung vorangegangen. Naeh Schottmüller und Much [2]) zeigen die Opsonine sehon zu Beginn der Erkrankung und bei den leiehtesten Infektionen eine Abweiehung von der Norm, wo Agglutininbildung nieht naehzuweisen ist, die Widalsehe Reaktion also im Stieh läßt.

Man kann, da die Immunopsonine thermoresistenter sind als die normalen, die Indizes des 10 Minuten auf 60° erhitzten und des nieht erhitzten Serums vergleiehen: besteht hierbei eine große Differenz, so beweist dies, daß es sich um normale, nicht dureh Bakterienresorption veränderte Opsoninverhältnisse handelt; wird dagegen das Serum dureh die Erhitzung nicht wesentlieh in seiner Wirksamkeit abgesehwäeht, so wäre Infektion bzw. Immunisierung anzunehmen. — Die Erfahrungen über die Leistungsfähigkeit dieser diagnostischen Methoden sind noch spärliche.

2. Klinische Methode der Opsoninbestimmung nach Kämmerer [3]).

Hierzu sind erforderlieh:

1. Serum des Patienten, in der gewöhnlichen Weise entnommen, aktiv, d. i. nicht erhitzt; ebenso Serum eines Gesunden.

1) Sauerbeck, Neue Tatsachen und Theorien der Immunitätsforschung; Bergmann, Wiesbaden 1907.

2) Schottmüller und Much, Münch. med. Wochenschr. 1908, No. 9.

3) Münch. med. Wochenschr. 1908, No. 20.

2. Eine Bazillenemulsion in physiolog. Kochsalzlösung, die 1,5 % Natriumzitrat enthält.
3. Blut einer gesunden Person, aus der Fingerbeere gewonnen und direkt in die Wrightsche Kapillarpipetten aufgesogen (siehe 1 e, S. 86).
4. Im übrigen dieselben Geräte wie unter 1 f—m aufgezählt.

Ausführung.

In die Kapillare saugt man bis zur Marke 1 Teil Blut der gesunden Person, dann etwas Luft, neuerdings 1 Teil Blut, dann wieder Luft, 1 Teil Patientenserum, Luft und endlich 1 Teil Bazillenemulsion.

In die Kapillare 2 saugt man 1 Teil Blut, Luft, 1 Teil Blut, Luft, Normalserum, Luft, Bazillenemulsion.

Die Durchmischung und weitere Behandlung erfolgt genau wie bei 1 (S. 87) beschrieben. Rasches Arbeiten erforderlich. Nach Abschmelzen kommen die Kapillaren auf $^1/_2$ Stunde in den Brutschrank. Die Ausstriche werden auf Deckgläser gemacht und nach der Färbung in Kanadabalsam eingeschlossen, was infolge der größeren Durchsichtigkeit des Präparates die Zählung erleichtert.

Als Vorteile der Methode werden hervorgehoben: 1. Vereinfachung der Technik durch Fortfall des getrennten Auffangens und Waschens der Blutkörperchen. 2. geringere Schädigung der Leukozyten durch Waschen und Zentrifugieren. 3. relativ dichte Lagerung der Leukozyten, Erleichterung der Zählung. 4. Verstärkung der „ambozeptorartigen Immunopsonine“ durch das Komplement und Vergrößerung des Unterschiedes zwischen Normal- und Patientenserum.

Erfahrungen mit dieser Methode fehlen noch.

X. Nachweis von Antistaphylolysin im Serum.

(Bei Patienten, die an Staphylokokkenerkrankungen leiden.)

Prinzip: Es wird ermittelt, in welchen Dosen das betreffende Serum imstande ist, Kaninchenerythrozyten vor der Auflösung durch Staphylolysin zu schützen.

Hierzu sind erforderlich:

a) 2—3 ccm defibriniertes Kaninchenblut.

Auffangen des aus der durchtrennten Karotis (siehe S. 4) ausfließenden Blutes in einem mit Porzellanperlen etwa fingerhoch beschickten dickwandigen Reagenzglas, das nach Verschluß mit Kork- oder Kautschukstopfen gründlich durchgeschüttelt wird. (Nicht zu voll mit Blut anfüllen!)

Bei langohrigen Rassen kann man das Blut aus der Randvene des Ohres entnehmen. Zu diesem Zweck wird das Ohr gründlich mit einem in Äther getauchten Wattebausch abgerieben, bis sich die Gefäße prall füllen und dann mit einem scharfen Skalpell die Randvene quer durchtrennt. Das abtropfende Blut wird in einem graduierten, mit 2—3 ccm 1 %iger Natriumzitratlösung beschickten Röhrchen aufgefangen und fortwährend gut durchgemischt, um den Eintritt der Gerinnung zu verhindern, bis 2—3 ccm Blut gewonnen sind, das Volum des Gemisches also 4 — 6 ccm beträgt.

Das Zitratplasma wird nun aus dem Blute durch wiederholten Zusatz der 10fachen Menge Kochsalzlösung und Abzentrifugieren (Waschen der Blutkörperchen) entfernt und der am Boden zurückbleibende Blutkörperchensatz durch Hinzufügen von NaCl-Lösung schließlich auf das ursprüngliche Volum von 2—3 ccm gebracht;

b) Staphylolysin. Am geeignetsten für die Staphylolysinproduktion erwies sich eine Nährbouillon, die $^2/_6$—$^3/_6$ jener Alkalimenge zugesetzt erhielt, welche erforderlich gewesen wäre, um Phenolphthalein gegenüber einen deutlichen Farbenumschlag in Rot hervorzurufen. (Natürlich

muß diese Alkalimenge an einem kleinen Teil, etwa 10 cem, der Bouillon unter Phenolphthaleinzusatz zuerst durch Titration gefunden, und dann auf die gesamte Bouillonmenge umgerechnet werden.) In $^1/_2$—1 l dieser Bouillon wird dann Staphylococcus aureus eingesät, nachdem man sich durch einen Vorversuch überzeugt hat, daß derselbe überhaupt Hämolysin zu produzieren vermag. Zu diesem Zweck hat man eine Reihe von Reagenzgläsern mit je 2 ccm Bouillon beschickt und mit dem Staphylokokkenstamm geimpft. Vom dritten bis vierten Tag an untersucht man täglich je ein Röhrchen durch Zugabe eines Tropfens defibrinierten Kaninchenblutes und Einstellen für zwei Stunden in den Brutschrank. Tritt kräftige Hämolyse ein (die unter Umständen erst nach 18stündigem Sedimentieren im Eisschrank, oder nach Zentrifugieren sichtbar wird), so ist der Stamm für den Versuch geeignet.

Nach 13—14tägigem Wachstum wird dann die Massenbouillonkultur durch ein Berkefeldtsches Filter keimfrei filtriert und mit 0,5% Karbolsäure versetzt im Eisschrank konserviert. Daselbst hält sich das Staphylolysin wochen- und monatelang ohne wesentliche Einbuße seiner Wirksamkeit;

c) das zu untersuchende Patientenserum, $^1/_2$ Stunde auf 56° erhitzt (inaktiviert);

d) physiologische Kochsalzlösung;

e) kleine Reagenzröhrchen, mit etwa 1 cm Durchmesser, 10 cm Länge;

f) Meßpipetten, in Zehntel geteilt, und andere, in Hundertstel geteilt (Inhalt 1 ccm und 10 ccm);

g) eventuell: normales, im Vakuum getrocknetes Pferdeserum als Standardserum. Dasselbe wird jedesmal frisch im Verhältnis 1 : 10 in sterilem, destilliertem Wasser gelöst.

Ausführung.

Dieselbe setzt sich aus zwei Bestimmungen zusammen:

1. Aus der Bestimmung der Wirksamkeit des Staphylolysins;

2. aus der Ermittlung der antagonistischen Wirksamkeit des Patientenserums.

ad. 1. In eine Reihe von Reagenzröhrchen kommen folgende Mengen des Staphylolysins:

1,0 0,75 0,5 0,25 0,1

ferner von einer 10fachen Verdünnung desselben mit Kochsalzlösung (1 ccm Lysin + 9 Kochsalzlösung):

0,75 (=0,075) 0,5 (=0,05) 0,25 (=0,025) 0,1 (=0,01)

endlich von einer 100fachen Verdünnung (1 ccm 10fache Verdünnung + 9 Kochsalzlösung):

0,75 (=0,0075) 0,5 (=0,005) 0,25 (=0,0025) 0,1 (=0,001)

Sämtliche Röhrchen werden mit Kochsalzlösung auf 2 ccm aufgefüllt und je ein Tropfen des Kaninchenblutes unter Umschütteln zugesetzt. Die Röhrchen bleiben zwei Stunden bei 37° und kommen, nachdem das Resultat notiert wurde, über Nacht in den Eisschrank. Am nächsten Morgen werden die Proben neuerdings nachgesehen; die Hämolyse ist meist nur unbedeutend weiter vorgeschritten als nach zweistündigem Aufenthalt im Brutschrank.

Die hierbei gefundene eben noch vollkommen klar lösende Dose des Staphylolysins wird nun für die Ermittelung der antihämolytischen Kraft des Patientenserums zugrunde gelegt.

ad. 2. In eine Reihe von Reagenzröhrchen kommt die eben ermittelte vollkommen lösende Dose des Staphylolysins.

Dazu dann folgende Mengen des zu prüfenden Serums:

1,0 0,75 0,5 0,25 0,1
0,075 0,05 0,025 0,01 (zugesetzt in Form des 10fach verdünnten Serums)
0,0075 0,005 0,0025 0,001 (zugesetzt in Form des 100fach verdünnten Serums)

Kontrolle ohne Serum.

Sämtliche Röhrchen werden mit Kochsalzlösung auf 2 ccm aufgefüllt, mit je einem Tropfen Blut versetzt und wie oben weiter behandelt. Notiert wird jene Serummenge, welche den hämolytischen Effekt eben vollkommen zu neutralisieren vermochte, derart, daß die über den Blutkörperchen stehende Flüssigkeit vollkommen ungefärbt bleibt. —

Um die zu verschiedenen Zeiten erhaltenen Wirkungswerte der antihämolytischen Patientensera miteinander vergleichen zu können, empfehlen Neisser und Wechsberg mit Rücksicht auf die mögliche Veränderung des benützten Staphylolysins gleichzeitig stets auch einen Hemmungsversuch mit normalem (durch Eintrocknen konservierten und daher unveränderlichem) Pferdeserum anzustellen. Die Vergleichung der beiden Hemmungsreihen (der mit dem Patientenserum und der mit dem Pferdeserum) gibt dann das Verhältnis der Wirksamkeit des untersuchten Antitoxins zu der konstanten des Standardantitoxins, somit einen von dem verwendeten Staphylolysin unabhängigen Wert. —

Nach Arndt[1]) und anderen ist ein hoher Antistaphylolysingehalt des Serums stets Zeichen einer Staphylokokkenerkrankung, wenn es auch nicht gelang sichere Grenzwerte festzulegen.

XI. Nachweis von Diphtherietoxin im Blutserum.

[Nach Uffenheimer[2]).]

Prinzip: Kleine Mengen Diphtherietoxin, die an und für sich zu gering sind, um Versuchstiere (Meerschweinchen) zu töten, können trotzdem nach 48 Stunden bei den-

1) Arndt, Deutsche med. Wochenschr. 1907.

2) Uffenheimer, Münchner med. Wochenschr. 1906 und 1907, No. 3.

selben deutliches Ödem bzw. Infiltrat an der Injektionsstelle hervorzurufen.

Zum Toxinnachweis sind erforderlich:

a) 0,1—0,3 ccm Serum des Diphtheriepatienten;

b) ein Meerschweinchen von ca. 250 g Gewicht;

c) physiologische Kochsalzlösung zum Verdünnen des Serums;

d) eine sterilisierbare Spritze zu 2—4 ccm Inhalt;

e) ein (steriles) Spitzgläschen zum Mischen von Serum und Kochsalzlösung;

f) Sektionsbrett und Besteck.

Ausführung.

Die zu injizierende Serummenge wird mit Kochsalzlösung auf 2 bzw. 4 ccm ergänzt und dann dem Meerschweinchen unter die Bauchhaut gespritzt (nicht intramuskulär!).

Schon nach 17—20 Stunden kann ein sehr deutliches, teigiges Ödem der Bauchhaut zu fühlen sein; nach 48 Stunden wird dann das Tier durch Nackenschlag getötet, auf dem Sektionsbrett aufgespannt und Brust und Bauchhaut abpräpariert, wobei das Ödem sehr deutlich zu sehen ist.

Der diagnostische Wert dieser Methode ist noch nicht genügend festgestellt. Doch soll nach Uffenheimer manchmal der Nachweis echter Diphtherie schneller gelingen, als durch die bakteriologische Untersuchung. Andererseits ist aber die Reaktion auch bei sicherer Diphtherie nicht immer positiv.

Ant. Kämpfe, Jena.

Hübel & Denck, Leipzig
Kgl. Bayr. Hofbuchbinderei.